

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 115

Numer 115

Volume XV

Rok XV

OCTOBER 2012

PAŹDZIERNIK 2012

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Krakow**

Polskie

Stowarzyszenie

Biomateriałów

w Krakowie

EDITORIAL

COMMITTEE:

KOMITET

REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny

Jan Chłopek

Editor

Redaktor

Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji

Design

Projekt

Katarzyna Trała

Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF

EDITORIAL OFFICE:

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

30/A3, Mickiewicz Av.

30-059 Krakow, Poland

Akademia

Górniczno-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

Issue: 200 copies

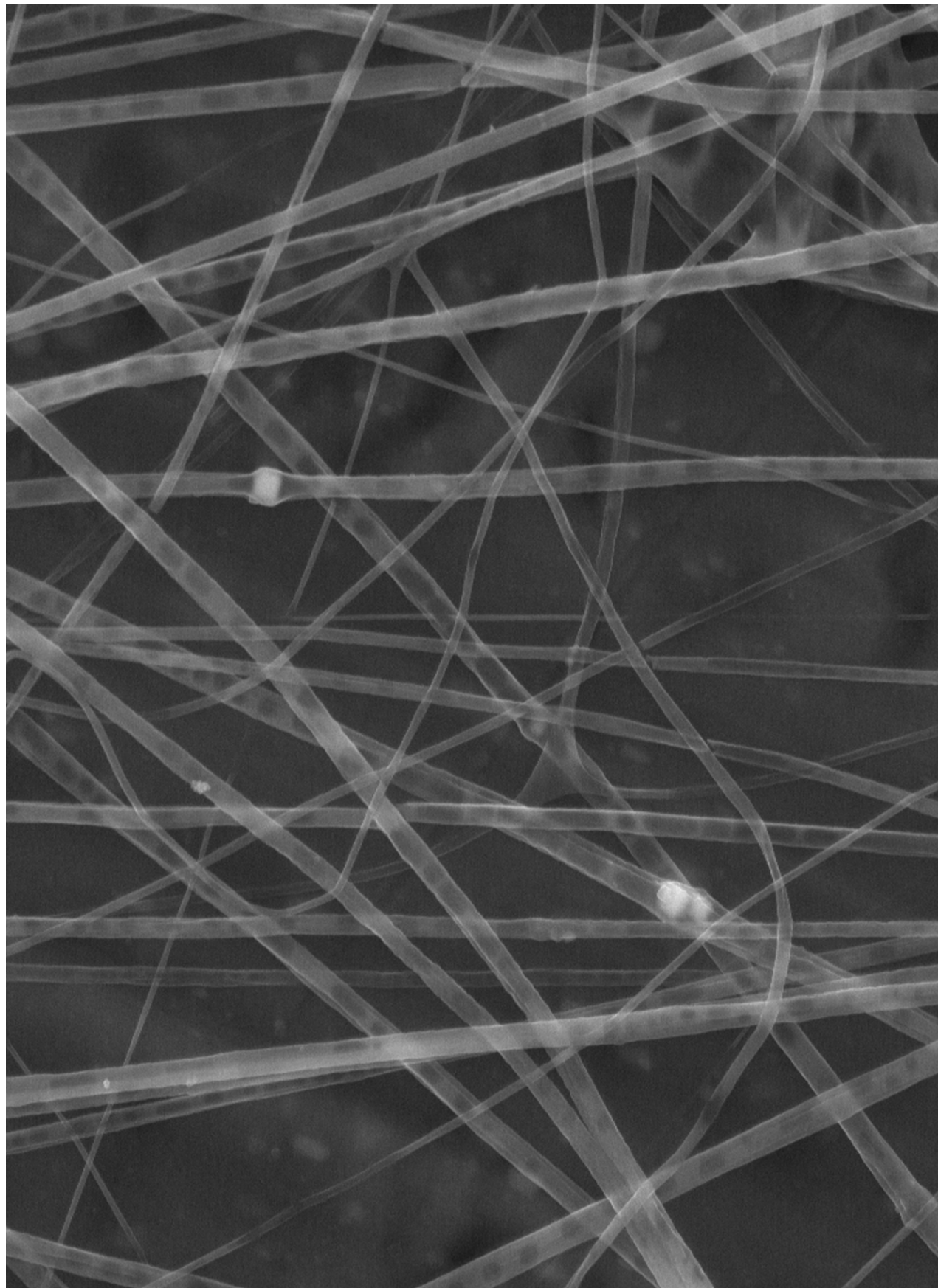
Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: wn@akapit.krakow.pl



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

Jan Ryszard Dąbrowski

POLITECHNIKA BIALOSTOCKA / BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

Matthias Epple

UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

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 Marciński

POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIA 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

Abhay Pandit

NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY

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

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcojęzycy 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, 12 617 25 61
tel./fax: (48) 12 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

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

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41
Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN
Konto:
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
ING Bank Śląski S.A. O/Kraków
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be 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.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:

Journal
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
AGH University of Science and Technology
Faculty of Materials Science and Ceramics
30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland

tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61
tel./fax: (48) 12 617 45 41
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:
www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:
Cost of one number: 20 PLN
Payment should be made to:
Polish Society for Biomaterials
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Krakow, Poland
ING Bank Slaski S.A.
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

*XXII Conference on
BIOMATERIALS
IN MEDICINE
AND
VETERINARY
MEDICINE*

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

www.biomat.agh.edu.pl



PAN
POLSKA AKADEMIA NAUK



SPIS TREŚCI

CHARACTERIZATION OF THE NOVEL CALCIUM PHOSPHATE/SULFATE BASED BONE CEMENTS JOANNA CZECHOWSKA, ZOFIA PASZKIEWICZ, ANNA ŚLÓSARCZYK	2
METAL IMPLANTS IN OSTHEOSYNTHESIS – CONSTRUCTION SOLUTIONS, MATERIALS AND APPLICATIONS ANNA HUTNIK, BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK, ARTUR SZUMLAŃSKI, WALDEMAR SERBIŃSKI	7
BADANIA MIKROSKOPOWE WŁÓKIEN Z POLILAKTYDU OTRZYMANÝCH TECHNIKĄ ELEKTROPRZĘDZENIA JAKO MATERIAŁÓW NA RUSZTOWANIA KOMÓRKOWE DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ ANNA SOCHA, MARTA BŁAŻEWICZ	12
WPLYW NOSZENIA NA STRUKTURĘ WODY I DEHYDRATACJĘ SILIKONOWO-HYDROŻELOWYCH SOCZEWEK KONTAKTOWYCH KATARZYNA KRYSZTOFIAK, MATEUSZ PŁUCISZ, ANDRZEJ SZYCZEWSKI	18
SYNTEZA ENZYMATYCZNA POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU) (PBS) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZĘPU <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> : NOWY, OBIECUJĄCY MATERIAŁ DLA ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH MIROŚLAWA EL FRAY, BOGUSŁAWA GRADZIK	26
ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPU BIOMEDYCZNEGO M30NW W OBECNOŚCI ALBUMINY I γ -GLOBULINY BARBARA BURNAT, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART	32
OCENA WYTRZYMAŁOŚCI MECHANICZNEJ KLEJÓW ORTODONTYCZNYCH W TESTACH BEZPOŚREDNICH BARTŁOMIEJ PAWLUS, ANDRZEJ DYSZKIEWICZ, MIŁOŚ ŚPIDLEN	38
OCENA WPLYWU SIMWASTATYNY NA DEGRADACJĘ TERPOLIMERU Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU ANNA JAROS, BOŻENA JARZĄBEK, KAMILA ROWIŃSKA, JANUSZ KASPERCZYK, HENRYK JANECZEK, ANNA SMOLA	45

CONTENTS

CHARACTERIZATION OF THE NOVEL CALCIUM PHOSPHATE/SULFATE BASED BONE CEMENTS JOANNA CZECHOWSKA, ZOFIA PASZKIEWICZ, ANNA ŚLÓSARCZYK	2
METAL IMPLANTS IN OSTHEOSYNTHESIS – CONSTRUCTION SOLUTIONS, MATERIALS AND APPLICATIONS ANNA HUTNIK, BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK, ARTUR SZUMLAŃSKI, WALDEMAR SERBIŃSKI	7
MICROSCOPIC STUDIES OF POLYLACTIDE ELECTROSPUN FIBRES DESIGNED FOR TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS ANNA SOCHA, MARTA BŁAŻEWICZ	12
THE INFLUENCE OF WEARING ON WATER STATES AND DEHYDRATION OF SILICONE- HYDROGEL CONTACT LENSES KATARZYNA KRYSZTOFIAK, MATEUSZ PŁUCISZ, ANDRZEJ SZYCZEWSKI	18
ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(BUTYLENE SUCCINATE) (PBS) CATALYZED BY LIPASE B FROM <i>CANDIDA ANTARCTICA</i> : A NEW PROMISING MATERIAL FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS MIROŚLAWA EL FRAY, BOGUSŁAWA GRADZIK	26
CORROSION RESISTANCE OF M30NW BIOMEDICAL ALLOY IN THE PRESENCE OF ALBUMIN AND γ -GLOBULIN BARBARA BURNAT, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART	32
EVALUATION OF MECHANICAL STRENGTH OF ORTHODONTIC ADHESIVES IN DIRECT TESTS BARTŁOMIEJ PAWLUS, ANDRZEJ DYSZKIEWICZ, MIŁOŚ ŚPIDLEN	38
THE INFLUENCE OF SIMVASTATIN ON TERPOLYMER DEGRADATION WITH SHAPE MEMORY PROPERTIES ANNA JAROS, BOŻENA JARZĄBEK, KAMILA ROWIŃSKA, JANUSZ KASPERCZYK, HENRYK JANECZEK, ANNA SMOLA	45

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

CHARACTERIZATION OF THE NOVEL CALCIUM PHOSPHATE/SULFATE BASED BONE CEMENTS

JOANNA CZECHOWSKA*, ZOFIA PASZKIEWICZ, ANNA ŚLÓSARCZYK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND
* E-MAIL: JCZECH@AGH.EDU.PL

Abstract

Calcium phosphate cements (CPCs) are a family of self-setting, bone repair materials. CPCs possess excellent biocompatibility, surgical handiness and adequate mechanical properties but reveal slow resorption *in vivo*. Currently, very interesting group of CPCs are biomaterials composed of α -tricalcium phosphate (α -TCP, α -Ca₃(PO₄)₂) and calcium sulfate. Calcium sulfate hemihydrate (CSH, CaSO₄·0.5 H₂O) possesses a long clinical history in different fields of medicine and is widely recognized as a safe, fast setting and resorbable implant material. The main goal of this study was to investigate how different factors influence the phase composition and physico-chemical properties of the new, cement-type material on the basis of α -TCP, CSH and anhydrous dicalcium phosphate (DCP, CaHPO₄). In presented work two different powder phase compositions and three liquid phases were used to produce new bone substitutes. XRD results showed that obtained materials, after setting and hardening, consisted of α -TCP, DCP, DCPD (CaHPO₄·2H₂O), HA and bassanite phases. Initial (I) and final (F) setting times of the cement pastes were determined with Gillmore needles and differed in the range of 4-14 min (I) and 10-30 min (F). Increase in the amount of CSH in the powder component resulted in shortening of setting time. Microstructure of cements was evaluated on the fractured samples by scanning electron microscopy (SEM) and the porosity via mercury porosimetry. Open porosity of the final materials was similar for all investigated compositions. Compressive strength depended on the composition and increased steadily over a period of maturation. The results obtained suggest that calcium phosphate/sulfate bone cement has the potential to be applied for bone augmentation.

Keywords: biomaterial, calcium phosphate, calcium sulfate, dicalcium phosphate anhydrous

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 2-6]

Introduction

Calcium phosphate-based bioceramics (CaPs), including hydroxyapatite (HA), are an outstanding class of bone grafting materials [1,2]. Calcium phosphate cements (CPCs) constitute a family of promising, self-setting biomaterials, evaluated nearly 30 years ago by LeGeross [3] as well as Brown and Chow [4]. CPCs are considered to be excellent bone void fillers because of the unique combination of osteoconductivity, biocompatibility and mouldability.

Calcium phosphate bone cements are obtained by mixing one or several calcium phosphate powders with an adequate amount of the aqueous solution to produce a shapeable paste, which hardens within a restricted period of time. This kind of materials can perfectly fill a bone cavity even in the most complex shape. Properties of the final material depend on the characteristics of solid and liquid phases, liquid to powder ratio and reaction conditions [1,2,5,6]. A great number of self-setting cement formulations have been developed during the last three decades [1,2,7-12]. Despite of numerous, mentioned above, advantages of calcium phosphate cements, they possess also some drawbacks and for this reason extensive researches are still conducted to develop an ideal, chemically bonded implant material. Currently the main concern of engineers and surgeons is to reach higher resorption rate and improved mechanical properties of CPCs, leading to more efficient bone reconstruction [1,2].

The resorption properties of calcium phosphate based biomaterials are generally believed to be related to the solubility of their constitutive phases. A number of CaPs ceramic and cement compositions have been studied to improve the bioactivity and biodegradation properties [11,12]. The main concept of biphasic calcium phosphate ceramics is aimed to strike the right balance between the high stability of hydroxyapatite and solubility of tricalcium phosphate (TCP, Ca₃(PO₄)₂) phases to control material resorption process [13].

Nowadays, very interesting group of CPCs are biomaterials based on α -tricalcium phosphate (α -TCP) and calcium sulfate. Calcium sulfate hemihydrate (CSH - CaSO₄·0.5 H₂O) is also known as a safe, biocompatible implant material which possesses a long clinical history [1,7,8,14-16]. Despite the numerous advantages, calcium sulfate possesses also some drawbacks. Its main disadvantage is too quick resorption rate which is considered to impede a gradual replacement of biomaterial by the new bone tissue. However, for the same reason calcium sulfate has found a new application and is used as a fast resorbable component of biocomposites, which produce the porosity *in vivo* [8,16,17].

Another interesting approach is combining α -tricalcium phosphate with dicalcium phosphate which during the chemical reaction can create octacalcium phosphate [9,10,12]. Octacalcium phosphate (Ca₈H₂(PO₄)₆·5H₂O; OCP) is more soluble and less stable at physiological conditions than calcium hydroxyapatite [18]. The hydrolysis of OCP to HA is thermodynamically favored and irreversible [19]. Monma et al. [9] obtained OCP via reaction of α -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate (CaHPO₄·2H₂O; DCPD) in water. The same product was formed in the cement composed of α -TCP and dicalcium phosphate anhydrous (CaHPO₄; DCPA). The hardening time of this CPCs was relatively slow, up to 30 minutes [10]. Synthetic OCP stimulates osteoblastic cell differentiation *in vitro* [20,21].

The aim of our study was to investigate how the initial powder and liquid phase compositions influence, after setting and hardening, the phase compositions, microstructure and compressive strength of the new cement type bone substitutes on the basis of α -TCP, CSH and DCP.

Materials and Methods

The investigated, self-setting composite cements were produced using dicalcium phosphate anhydrous (DCP, POCH, Poland), α -tricalcium phosphate and calcium sulfate hemihydrate (CSH, Acros Organics, USA).

Alpha-TCP powder was synthesized by a wet chemical method using chemical grade $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (POCH, Poland) and 85 wt% solution of H_3PO_4 (POCH, Poland). Obtained powder was sintered, ground in an attritor mill to the grain size below 0.06 mm and sieved. Two different powder batches: M-1 and M-2 were produced by mixing α -TCP and DCP (CaHPO_4) with 20 wt% and 30 wt% calcium sulfate hemihydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$), respectively (TABLE 1). The weight ratio of α -tricalcium phosphate and dicalcium phosphate in the powder batches was fixed and equal 7:3. Mixing process was performed using the Retsch MM400 mixer mill (5 Hz/5 min). Distilled water and Na_2HPO_4 solutions (2.0 wt% and 2.5 wt%) were applied as liquid phases in pastes preparation.

TABLE 1. Initial powder composition of the studied cements.

Cement	α -TCP [wt%]	DCP [wt%]	CSH [wt%]
M-1	56	24	20
M-2	49	21	30

Setting times

Initial (I) and final (F) setting times of obtained cement pastes were determined using the Gillmore needles according to ASTM C266-04 specification (3 samples per each measurement) [22]. The appropriate amounts of powder (P) and liquid (L) phase were mixed in a mortar for 1 min to produce mouldable, self-setting materials. Liquid to powder ratio (L/P) was the same for both cements, namely 0.44 ml/g. All experiments were performed at $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Phase composition

Phase composition of the hardened cement bodies was characterized by X-ray diffraction method using $\text{CuK}_{\alpha 1}$ radiation, Ni-filter and the standard Bragg-Brentano geometry. Data were collected in the 2θ angle range of 10 – 90° with a step size of 0.002° (Philips diffractometer, X'Pert Pro). The Rietveld method was used for the quantitative phase analysis.

Microstructure

Microstructure of the fractured set cements was measured by scanning electron microscopy (SEM, Nova NanoSem 200). Chemical compositions in microareas were determined using Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS, Model 4457F_ISUS-SN). All samples were carbon-sputtered to prevent surface charging effects.

Porosity

Mercury intrusion porosimetry (MIP, Autopore IV Micro-meritics) was applied to determine the open porosity and pore size distribution within the cement samples.

Compressive strength

The compressive strength of set cements was evaluated as the average value of 10 cylindrical specimens (6 mm in diameter and 12 mm in high), tested under compression at a cross-head speed of 2 mm min^{-1} in the Universal Testing Machine (Instron 3345). Mechanical tests were performed: 1, 7, 14 and 28 days after setting. Samples for compression test were stored at 37°C .

Results and Discussion

Setting times

The initial and final setting times of the obtained materials differed in the range from 4 to 7 min (I) and from 10 to 30 min (F) (TABLE 2). The setting times strongly depended on the concentration of Na_2HPO_4 in the liquid phase.

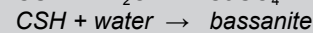
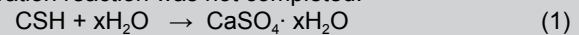
TABLE 2. Setting times of studied cement compositions.

Liquid phase	Material	L/P [ml/g]	Initial setting time I [min]	Final setting time F [min]
Distilled water	M-2	0.44	14	30
2.0 wt% Na_2HPO_4	M-1	0.44	7	22
	M-2		6	18
2.5 wt% Na_2HPO_4	M-1	0.44	4	10
	M-2		4	13

The setting time obtained when distilled water was used as the liquid phase reached 30 minutes and was too long from the clinical point of view. Increase in the concentration of Na_2HPO_4 in the solution resulted in faster setting process of CPC pastes. Values achieved when 2.5 wt% Na_2HPO_4 was used were found to be the most suitable for future applications.

Phase composition

Results of XRD analysis (FIG. 1) revealed presence of bassanite phase in both materials and indicated that the hydration reaction was not completed.



Calcium sulfate hemihydrate reacted with the aqueous solutions (equation 1) and created not fully hydrated calcium sulfate: $\text{CaSO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, where $0.5 \leq x < 2.0$. Presumably presence of α -TCP phase in the initial cement composition influenced hydration process of calcium sulfate by formation of a calcium phosphate layer on the calcium sulfate crystals. This process could lead to the passivation of their surface and impede the reaction with water.

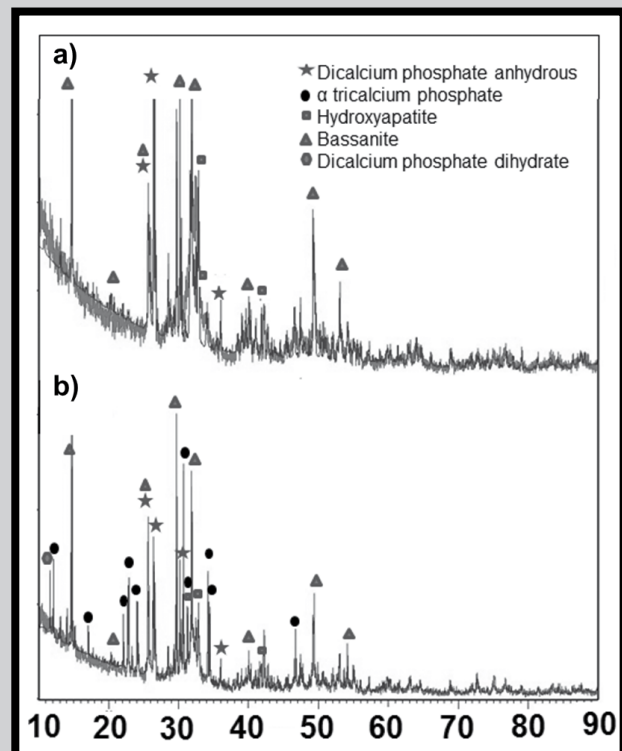


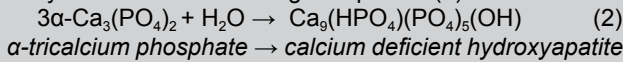
FIG. 1. XRD patterns of the set and hardened cements: a) M-1 and b) M-2.

After setting studied cements composed also with hydroxyapatite and anhydrous dicalcium phosphate (DCP). Alpha-TCP and small amounts of brushite (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) phase occurred in the case of cement M-2 (TABLE 3).

TABLE 3. Phase composition of the studied cements 4 weeks after setting.

Cement	HA [wt%]	Bassanite [wt%]	α -TCP [wt%]	DCP [wt%]	DCPD [wt%]
M-1	51	17	0	32	0
M-2	13	33	26	26	2

Presence of DCP in the set and hardened body indicates on the high stability of this phase and very limited reaction with water as well as with α -TCP. Hydroxyapatite phase is created not as expected via conversion from intermediate phase (octacalcium phosphate), but by the process of hydrolysis of α -TCP according to equation (2).



This observation stays in agreement with researches conducted by Fernandez et al. [23]. Results of his studies showed that for the cement composed of α -TCP and DCP mechanism of setting did not involve the reaction between constituents. Probably kinetics of setting process is the reason why DCP remained in the final material.

Fernandez explained the lack of DCP reactivity by a blocking effect in the dissolution of this compound due to a process of heterogeneous nucleation.

In the case of cement M-1 the whole amount of tricalcium phosphate phase completed hydrolysis process whereas for cement M-2 as much as 26 wt% of α -TCP remained unreacted in the material. Presence of higher amount of calcium sulfate in the cement M-2 seemed to retard hydration process of α -TCP to hydroxyapatite. These results stayed in the agreement with the studies performed by Durucan and Brown [24] as well as Czechowska et al. [25] who confirmed that presence of CSH delayed hydroxyapatite formation.

Microstructure

The scanning electron micrograph of the fractured cement samples are presented in FIG. 2.

SEM measurements showed that the microstructure was composed mainly with the tightly entangled calcium phosphate crystals. The compact matrix, created by calcium phosphate grains provided a mechanical rigidity to the cement. The large calcium sulfate-crystals (bassanite) were present in the form of blocks and plates embedded in the calcium phosphate matrix. No interconnected calcium sulfate needle-like crystals, characteristic for calcium sulfate dihydrate could have been noticed on the fractured surfaces. EDS results confirmed presence of calcium sulfate and calcium phosphate phase in the set cement samples (FIG. 3).

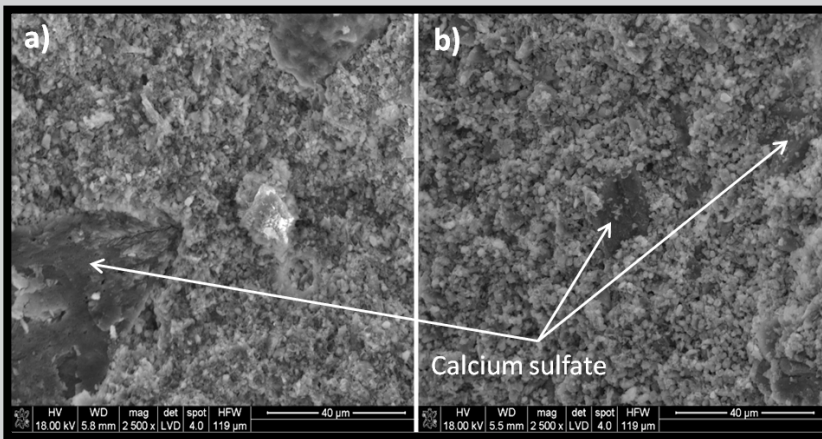


FIG. 2. SEM images of fractured hardened cement bodies: a) M-1, b) M-2.

Porosity

Mercury porosimetry analysis of the set cement samples revealed a bimodal pore size distribution (FIG. 4).

Open porosity values for the M-1 and M-2 cements were similar and equal 44% and 47%, respectively. Both materials possess pore size diameter ranging from 5 nm to around 1 μm . While interpreting obtained data we should be aware that mercury intrusion porosimetry has limitations when applied to materials with irregular pore geometry. For such materials MIP does not measure the true distribution of sizes for pore geometries found in the samples. If large internal pores are connected by narrow throats the mercury porosimetry will misrepresents their size and show just the diameter of throats [26]. This is known as the 'ink bottle' effect. The larger misfit between intrusion and extrusion curves the stronger influence of ink bottle effect on the results of porosity measurements. In the case of studied cements a small misfit between the curves is observed (FIG. 4 c,d). what indicates that also larger pores can be present in the hardened cements' bodies.

Two different kinds of pores were found in examined materials (FIG. 4). First, lower and wider peak (max. ~ 30 nm), was connected with voids between calcium phosphate grains, whereas the second, more narrow one (max. ~ 0.25 μm) may be assigned to the population of bigger pores present between agglomerates of CaPs grains. The bigger pores can be also connected with the presence of voids between calcium phosphate and sulfate crystals.

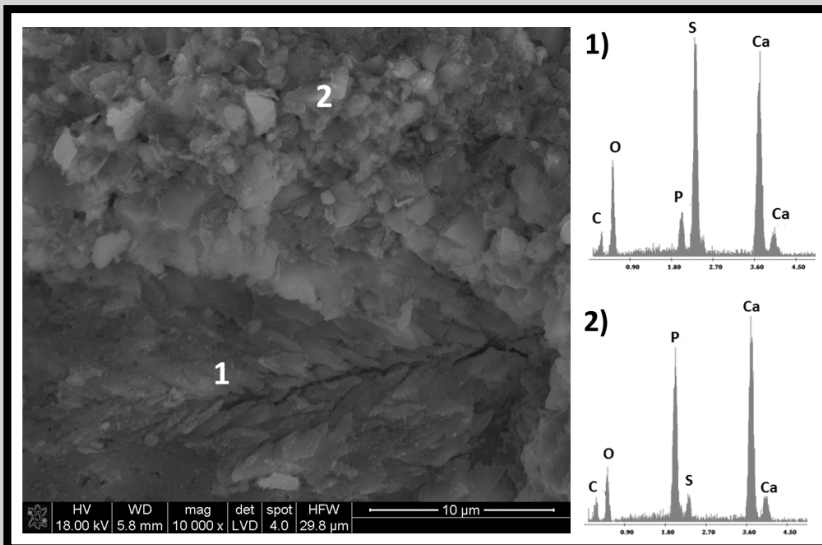


FIG. 3. EDX analysis of the crystals on the fractured surface of the M-1 sample.

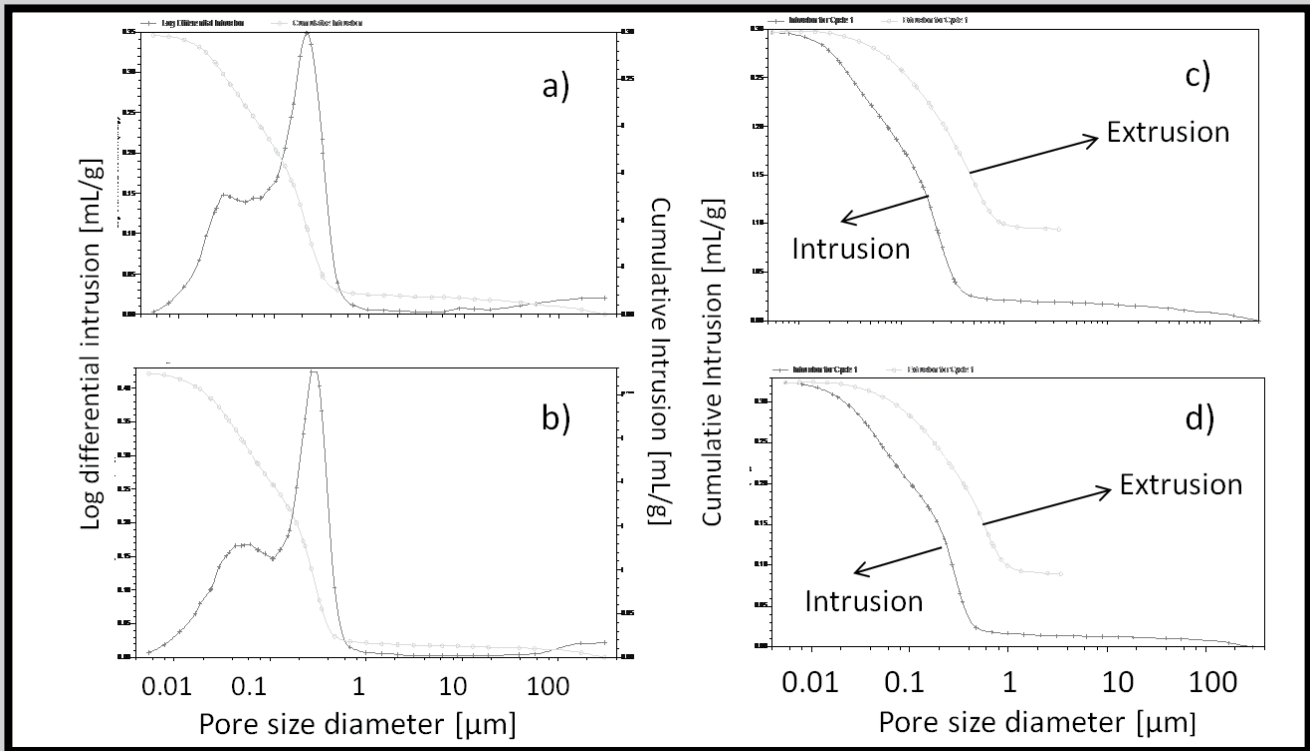


FIG. 4. Pore size distribution curves of examined cements: a) M-1, b) M-2. Curves representing intrusion and extrusion process: c) M-1, d) M-2.

Compressive strength

The results of compressive tests performed on the cement samples are presented in FIG. 5.

As expected the chemical composition of examined cements as well as maturation affect their mechanical properties. The compressive strength of obtained materials increased during the setting process and ranged from 4.1 MPa to 9.4 MPa for cement M-1 and from 6.7 MPa to 8.8 MPa for cement M-2. The amount of calcium sulfate in the initial powder composition of cements slightly influenced mechanical properties of the final samples. Material with 30 wt% of calcium sulfate possessed higher mechanical properties at the beginning of the experiment (after 1 and 7 days), however after 14 and 28 days compressive strength values were comparable for both materials. The setting time of commercially available CPCs is typically close to 10 min, however the setting and hardening reaction within the cement body take much longer - usually a couple of days. The influence of this process is visible in FIG. 4. Furthermore conversion of tricalcium phosphate into HA progresses in time, what simultaneously with process of hardening improved mechanical strength.

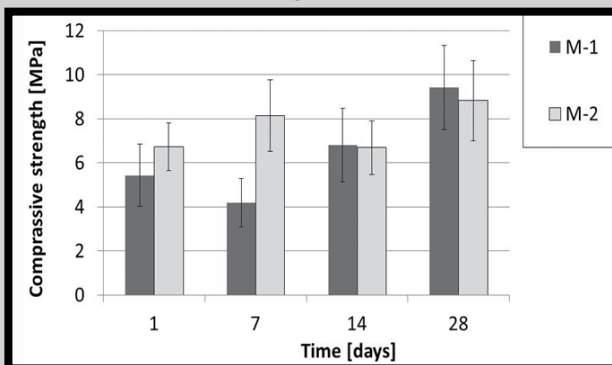


FIG. 5. Compressive strength of examined cement materials as a function of time.

Conclusions

1. The new, gradually resorbable bone cements based on α -tricalcium phosphate (α -TCP), anhydrous dicalcium phosphate (DCP) and calcium sulfate hemihydrate (CSH) were developed.
2. From the point of view of future medical applications the amount of 30 wt.% of CSH in the powder phase was established as the superior one.
3. Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) is an effective accelerator of the α -TCP setting reaction. 2.5 wt% solution of Na_2HPO_4 was found to be a liquid phase of choice in the case of examined materials.
4. The obtained cements possessed after setting and hardening bimodal pore size distribution with the pore diameters ranged from 5 nm to 1 μm .
5. Compressive strength of examined composite materials after 28 days reached up to ~9 MPa.
6. The obtained cement-type bone substitutes revealed good surgical handling and may be applied in filling bone defects.

Acknowledgements

This work has been supported by the project No UDA-POIG.01.03.01-00-005/09.

References

- [1] Kokubo T.: *Bioceramics and their clinical applications*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England 14 (2008) 302-325.
- [2] Bohner M.: Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury, Int. J. Care. Injured* 31 (2000) S-D37-47.
- [3] LeGeros R.Z., Chohayeb A., Shulman A.: Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative material, *J. Den. Res.* 61 (1982) 343-347.
- [4] Brown W.E., Chow LC.: A new calcium phosphate setting cement, *J. Dent. Res.* 62 (1983) 672-679.
- [5] Camire C.L., Gbureck U., Hirsiger W., Bohner M.: Correlating crystallinity and reactivity in an α -tricalcium phosphate, *Biomaterials* 26 (2005) 2787-2794.
- [6] Fernandez E., Gil F.J., Best S.M., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A.: Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: Compressive strength and microstructural development, *J. Biomed. Mater. Res.* 15;41(4) (1998) 560-7.
- [7] Nilsson M., Fernandez E., Sarda S., Lidgren L., Planell J.A.: Characterization of a novel calcium phosphate/sulphate bone cement, *J. Biomed. Mater. Res.* 61 (2002) 600-607.
- [8] Bohner M.: New hydraulic cements based on α -tricalcium phosphate-calcium sulfate dihydrate mixtures, *Biomaterials* 25 (2004) 741-749.
- [9] Monma H., Makishima A., Mitomo M., Ikegami T.: Hydraulic Properties of the Tricalcium Phosphate-Dicalcium Phosphate Mixture, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 96 (1988) 878-880.
- [10] Bermudez O., Boltong M.G., Driessens F.L.M., Planell J. A.: Development of an Octacalcium Phosphate Cement, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 5 (1994) 144-146.
- [11] Legeros R.Z.: Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin. Mater.* 14, 1993, 65-88.
- [12] Combes C., Bareille R., Rey C.: Calcium carbonate-calcium phosphate mixed cement compositions for bone reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res.* 79A (2006) 318-328.
- [13] Daculsi G., Laboux O., Malard O., Weiss P.: Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 14 (2003) 195-200.
- [14] Lazary A., Balla B., Kosa J. P., Bacsı K., Nagy Z., Takacs I., Varga P.P., Speer G., Lakatos P.: Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells, *Biomaterials* 28 (2007) 393-399.
- [15] Peng Wang, Eun-Jung Lee, Chee-Sung Park, Byung-Ho Yoon, Du-Sik Shin, Hyoun-Ee Kim, Calcium Sulfate Hemihydrate Powders with a Controlled Morphology, *J. Am. Ceram. Soc.*, 91 (2008) 2039-2042.
- [16] Fernandez E., Vlad MD., Gel M.M., Lopez J., Torres R., Cauchı JV., Bohner M.: Modulation of porosity in apatitic cements by the use of α -tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures, *Biomaterials* 26 (2005) 3395-3404.
- [17] Gangfeng Hu, Luwei Xiao, Hong Fu, Dawei Bi, Haitao Ma, Peijian Tong, Study on injectable and degradable cement of calcium sulphate and calcium phosphate for bone repair, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 21 (2010) 627-634.
- [18] Brown W.E., Smith J.P., Lehr J.R., Frazier A.W.: Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystallographic and Chemical Relations between Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite, *Nature* 196 (1962) 1050-1054.
- [19] LeGeros R.Z., Daculsi G., Orly I., Abergas T., Torres W.: Solution-mediated Transformation of Octacalcium Phosphate (OCP) to Apatite, *Scanning Microsc.* 3 (1989) 129-138.
- [20] Suzuki O., Kamakura S., Katagiri T., Nakamura M., Zhao B., Honda Y., Kamijo R.: Bone Formation Enhanced by Implanted Octacalcium Phosphate Involving Conversion into Ca-deficient Hydroxyapatite, *Biomaterials* 27 (2006) 2671-2681.
- [21] Liu Y., Cooper P. R., Barralet J. E., Shelton R. M.: Influence of Calcium Phosphate Crystal Assemblies on the Proliferation and Osteogenic Gene Expression of Rat Bone Marrow Stromal Cells, *Biomaterials* 28 (2007) 1393-1403.
- [22] ASTM C266-04. ASTM Annual Book of standards, Standard Test Method for Time Setting of Hydraulic-Cement paste by Gillmore Needles, West Conshohocken, PA 19428-2959, USA.
- [23] Fernandez E., Gil F.J., Best S., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A.: The cement setting reaction in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: An X-ray diffraction study, *J. Biomed. Mater. Res.* 5;42[3], (1998) 403-6.
- [24] Durucan C., Brown P. W.: Reactivity of α -Tricalcium Phosphate, *J. Mater. Sci.* 37 (2002) 963-969.
- [25] Czechowska J., Paszkiewicz Z., Zima A., Pijocha D., Ślósarczyk A.: Influence of heat treatment of titanium-doped hydroxyapatite (TiHA) on properties and in vitro behaviour of calcium sulfate – TiHA composites, *Ceram. Mater.* 63 [4] (2011) 758-764.
- [26] Abell A.B., Willis K.L., Lange D.A.: Mercury Intrusion Porosimetry and Image Analysis of Cement-Based Materials, *J. Coll. Int. Sci.* 211 (1999) 39-44.

METAL IMPLANTS IN OSTHEOSYNTHESIS – CONSTRUCTION SOLUTIONS, MATERIALS AND APPLICATIONS

ANNA HUTNIK¹, BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK^{1*}, ARTUR SZUMLAŃSKI²,
WALDEMAR SERBIŃSKI¹

¹ GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MECHANICAL FACULTY,
UL. G. NARUTOWICZA 11/12, 80-233 GDAŃSK, POLAND

² HOSPITAL IN INOWROCLAW,
UL. POZNAŃSKA 97, 88-100 INOWROCLAW, POLAND

* E-MAIL: BEAZUREK@PG.GDA.PL

Abstract

Every day human bones undergo different injuries resulting from public transport accidents, diseases or trauma. Consequently, they cause temporary or constant patients disability or even death. Fractures happen not only to elderly people suffering from osteoporosis, but also more and more frequently to young people, who got some injuries as a result of life style, e.g. doing sports. The desire to enhance the physical well being and quality of patients' life, who got some injury causes constant development of medical devices for osteosynthesis. In the case of complicated fractures, in which plaster treatment is not sufficient, surgical treatment and applying implant are indispensable.

The aim of the article is to present two case studies on intramedullary nails. The first one concerns a method of osteosynthesis for a patient, who was injured in an accident. The second one presents the failure of the implanted intramedullary nail. The research included evaluation of the type of fracture and the analysis of microstructure, chemical composition and hardness of the implant materials.

Keywords: metal implants, osteosynthesis, intramedullary nail, fracture

[*Engineering of Biomaterials 115 (2012) 7-11*]

Introduction

The metal implants application dates back to the ancient times. Up today, they are used in the osteosynthesis techniques, although their construction or chemical composition underwent considerable modifications. Metal alloys improved throughout centuries became the essential material applied in bone surgery and orthopaedics. While choosing the biomaterial the biocompatibility is taken into consideration. This feature is strictly connected with proper functioning of the implant in the body, as well as its non-toxicity and no influence on the immunological system of the body. Materials designed for implants should be bifunctional and show compatibility with the body and not cause undesirable effects such as allergies and blood coagulation. In the case of metal alloys used for implants, static and dynamic endurance, corrosion resistance, frictional wear and suitable electro-magnetic properties are of great importance [1].

The properties of the metal implants should be adapted to those of bone tissue. The mechanical properties of a bone are characterized by anisotropy resulting from their structure, and its structure is influenced by the inside tension and deformations.

According to Wolf's law trabecular structure of bone tissue in balance adjusts itself to the direction of the main tensions. As a result any change in loading causes the adjustment of bone structure to a current tension. From physical point of view a bone is a unit composed of many solid phases surrounded by the liquid phase. The bone tissue has also an organic phase. Owing to that it is highly elastic and is resistant to loading. It stretches very little and bends only to some extent and then breaks. The mechanical properties of bones depend on the age (the greatest endurance is for people aged 30 and then it decreases), structure, the amount of collagen, type of loading and shape [2,3].

The elastic properties are the basic mechanical bone properties (Young's modulus, Poisson's factor, Kirchhoff's modulus, endurance to stretching, squeezing and cutting) [4]. Young's modulus has significant importance in implants. While producing implant materials it is desirable to lower the Young's modulus to the value typical of bone. The low Young's modulus is of great importance for eliminating stiff systems and obtaining elastic fixation of bone and implant. Of all known metallic biomaterials the lowest Young's modulus have titanium alloys, particularly the Ti-Nb-Zr-Ta alloy (FIG. 1) [5].

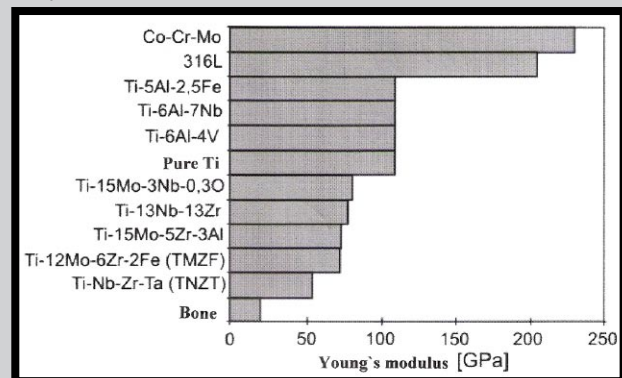


FIG. 1. The Young's modulus for different kinds of metallic materials used in implantology as compared with bone [5].

The aim of the implant is to join or replace bone tissue. Therefore it should be mechanically similar to bone, so that the system can cooperate. In the case of metals it is difficult to achieve it, however, the biomaterials made from different kinds of alloys are more and more effective in performing functions of bones enabling patients normal functioning in life. Implants are chosen separately for each patient according to their age, sex, weight, height as well as the condition of bone tissue. Therefore accurate analysis of mechanical properties is indispensable (TABLE 1) [2].

As far as metal implants are concerned it should be remembered, that human organism is a complicated working environment. The composition of body liquids can be compared with sea water. The Cl, Na, K, Ca, Mg ions and the organic compounds, which the environment contains, makes it aggressive [6]. Another important factor is pH, which in normal conditions in human body is 7.4 and in the place of implant may show acidic value. Constant and relatively high body temperature should be also taken into consideration in corrosion process of the implants. Additional difficulty results from constant loading of the implant connected with the structure and functioning of the human body or lack of loading, when the bone tissue around the implant is destroyed by excessive strength. All these factors are responsible for the destructive environment for an implant. When choosing proper material for the implant it should be remembered, that it must meet some requirements, which prevent it from destruction [7-9].

TABLE 1. The properties of implants used in bone surgery [2].

Physical properties	Human bone	CrNiMo 316L steel	Co-Cr-Mo alloy Protasul – 2	Ti-6Al-4V alloy
Chemical compounds	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH CaHPO ₄ ·2H ₂ O Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ 2H ₂ O CaCO ₃	Cr: 17-19% Ni: 13-15% Mo: 2.5-3.5% Mn: 2.0% Si: 1.0%	Cr: 26.5-30% Mo: 4.5-70% Ni: 2.5% Mn, Fe, Si: 1% Co: rest	Al: 5.5-6.7% V: 3.5-4.5% Ti: rest
Tensile strength R _m [MPa]	130	590-1100	665	850-1120
Compressive strength R _e [MPa]	200	-	-	-
Bending strength R _g [MPa]	120	-	-	-
Bending fatigue strength R _{zg} [MPa]	-	240	250	500
Yield point R _{0.2} [MPa]	-	190-690	450	895-1080
Elongation A ₅ [%]	0.02	12-40	8	10-15
Elastic modulus E [MPa]	1.8-1.9 x 10 ⁴	2.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁵

The cooperation between implant and tissue goes in two directions. It includes the impact of implant on tissue and reaction of tissue on a foreign body or products of its degradation. The reactions of human body on implant may result in different kinds of destruction. In the case of implants used for osteosynthesis they are: fretting, pitting, galvanic corrosion, intercrystalline corrosion, hydrogen corrosion, fatigue as well as mechanical damage [7-9].

Each surgical procedure gives a risk of some complications. Apart from some mechanical and endurance properties the phenomenon of biocompatibility in the tissue and body fluids is of great importance. Biocompatibility and mechanical properties allow to diminish the danger of their destruction, as well as allergic reactions and some tissue irritation [10].

The existence of an implant encourages immunological system to create the antibodies, which gather around and penetrate it. As a result of aggressive environment corrosion process of the implant advances, which causes releasing of ions from the metal. That in turn causes undesirable and harmful reactions resulting in the failure of osteosynthesis process [11-14].

Human bone structure is subjected to different injuries such as fracture. The fracture of femur stem is a very serious problem. It is the longest human bone and complete recovery takes long time. For treatment the most effective method should be chosen as it enables quick recovery and rehabilitation. The choice of proper implant made of proper material is necessary to achieve the proper treatment of the bone tissues.

Materials and Methods

The first case study concerned a male patient aged 25 suffering from uncomplicated fracture of calve bone (FIG. 2). The patient underwent patch test on metals to select the proper material for the implant. After 48 h the allergic reaction was checked. It turned out the man was allergic to chromium. Two of all metallic alloys used in orthopaedics contain large amount of chromium, they are: stainless steel and cobalt alloy (TABLE 2) [15]. Therefore for this patient titanium alloy implant was chosen. It is an implant commonly used for allergic patients in the case of long bone fractures.

The second case study concerned a patient with intramedullary nail fracture (Gamma nail) (FIG. 3). After retrieval from the patient the chemical composition of the Gamma nail material was examined by means of the Scanning Electron Microscope Philips XL 30 under with different magnifications (from 23x to 1000x), equipped with devices to analyse the chemical composition (EDS).

**FIG. 2. The fracture of femur stem.****TABLE 2. Chemical composition of metallic alloys used in orthopaedics [15].**

Alloy	Ni	Co	Cr	Ti	Mo	Al
Stainless steel	13-15	-	17-19	-	2-4	-
Cobalt alloy	-	62-67	27-30	-	5-7	-
Titanium alloy	-	-	-	81-91	-	5.5-6.5
Nitinol	45-49	-	-	51-55	-	-

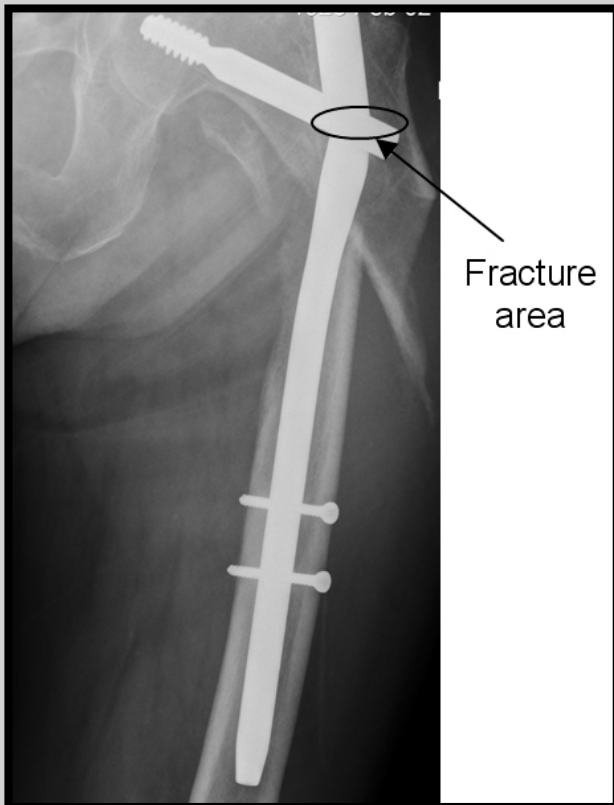


FIG. 3. The picture of Gamma nail in the leg after breaking.

Results and Discussion

The first case study

In cross-breaking of long bones, as in the first case the most effective method is the intramedullary method. It is a little invasive method and does not carry the danger of many complications. The healing process is similar to natural one and enables quick recovery of the injured bone. To avoid improper fixation of broken bone, the nail above and below the fracture should be fixed. This method depends on proper positioning of the screws in the nearest required distance of the bone and accelerates the process of bone fixation (FIG. 4). By means of X-Ray examination the length of the implant equal to 400 mm and diameter of 9 mm were chosen.

The process of bone fixation was controlled by X-Ray examination in order to place the implant in the proper place (FIG. 5a). Owing to proper and steady rehabilitation and the patient's cooperation, which started few days after the operation, the bone was united properly, which was confirmed by X-Ray photos two years later and than two and a half years after removing the implant (FIG. 5b and FIG. 5c).

The second case study

The analysis of Gamma nail fracture started with macroscopic observation of the outer surface as well as the whole surface in the fracture area. No signs of mechanical or corrosion destruction were observed on the outer surface, while some plastic deformation of the nail in the contact place with the screw was observed. The chemical composition of the Gamma nail material examined by means of the Scanning Electron Microscope Philips XL 30, equipped with devices to analyse the chemical composition (EDS) is presented in FIG. 6.

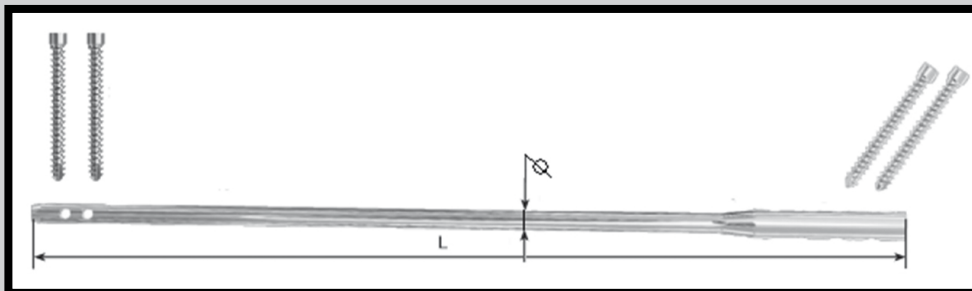


FIG. 4. The construction of the nail used in a given case.

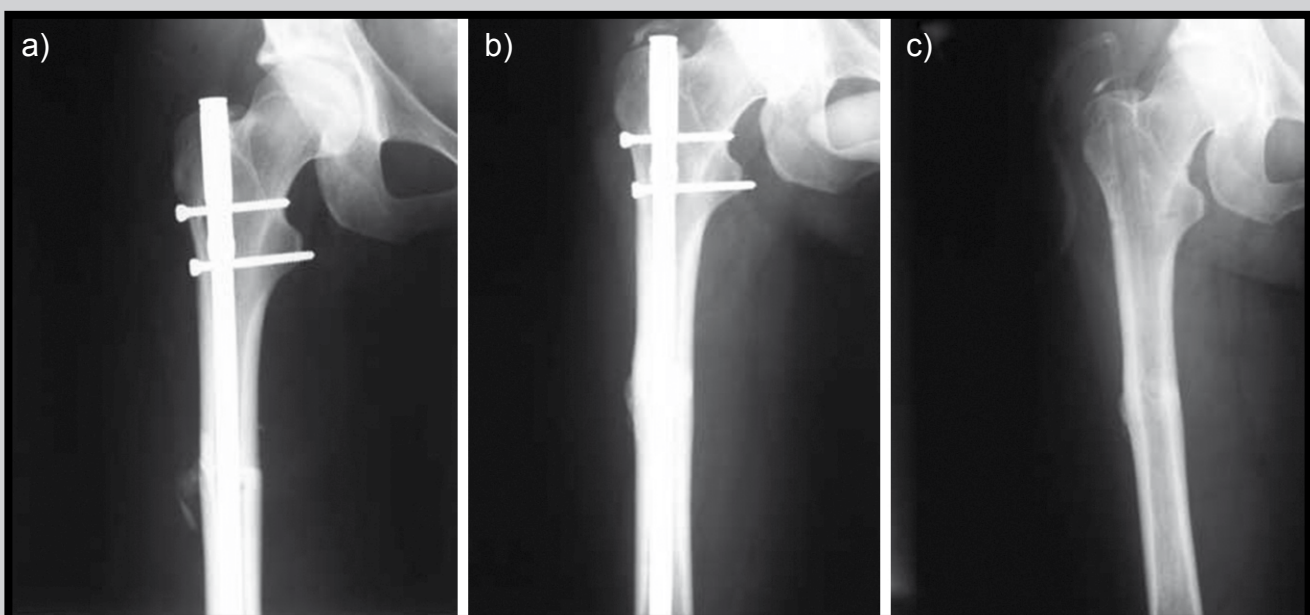


FIG. 5. X-Ray photos taken after: a) inserting the implant, b) two years after inserting the implant, c) two and a half years after removing the implant.

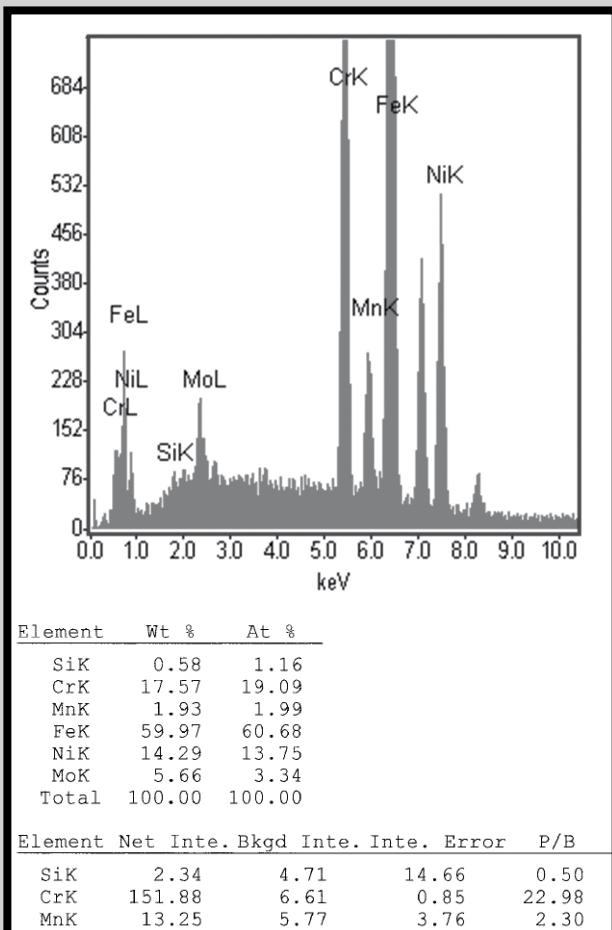


FIG. 6. The spectrum and the chemical composition of the Gamma nail material.

TABLE 3. The hardness HV30 of the intramedullary nail.

The Gamma nail element	The average hardness HV30
Nail	321
Screw	320

The chemical composition analysis proves that the material of the examined nail is Cr-Ni-Mo alloy. According to the Schaeffler's diagram [16], the austenitic structure of the examined material was found. Its hardness was defined by means of Vickers method of measurement by loading of 294.2 N. The average hardness of the Gamma nail and screw is presented in TABLE 3.

The pictures of the Gamma nail fractures are presented in FIG. 7. It was found that both the nail and the screw cooperating with it are equally hard (321 and 320 HV), which proves the proper combination of the materials in the construction of the examined nail. The observations of the Gamma nail fracture suggest that failure was due to fatigue. The analysis of biomechanical loading of the nail and the fracture indicates that concentration of variable stresses most probably appeared of the whole edge in the Gamma nail. It cannot be excluded that the fracture might have been started due to micro fractures caused by the impact of loading (for example a patient's fall) and its further advancement in the course of further use of the examined Gamma nail.

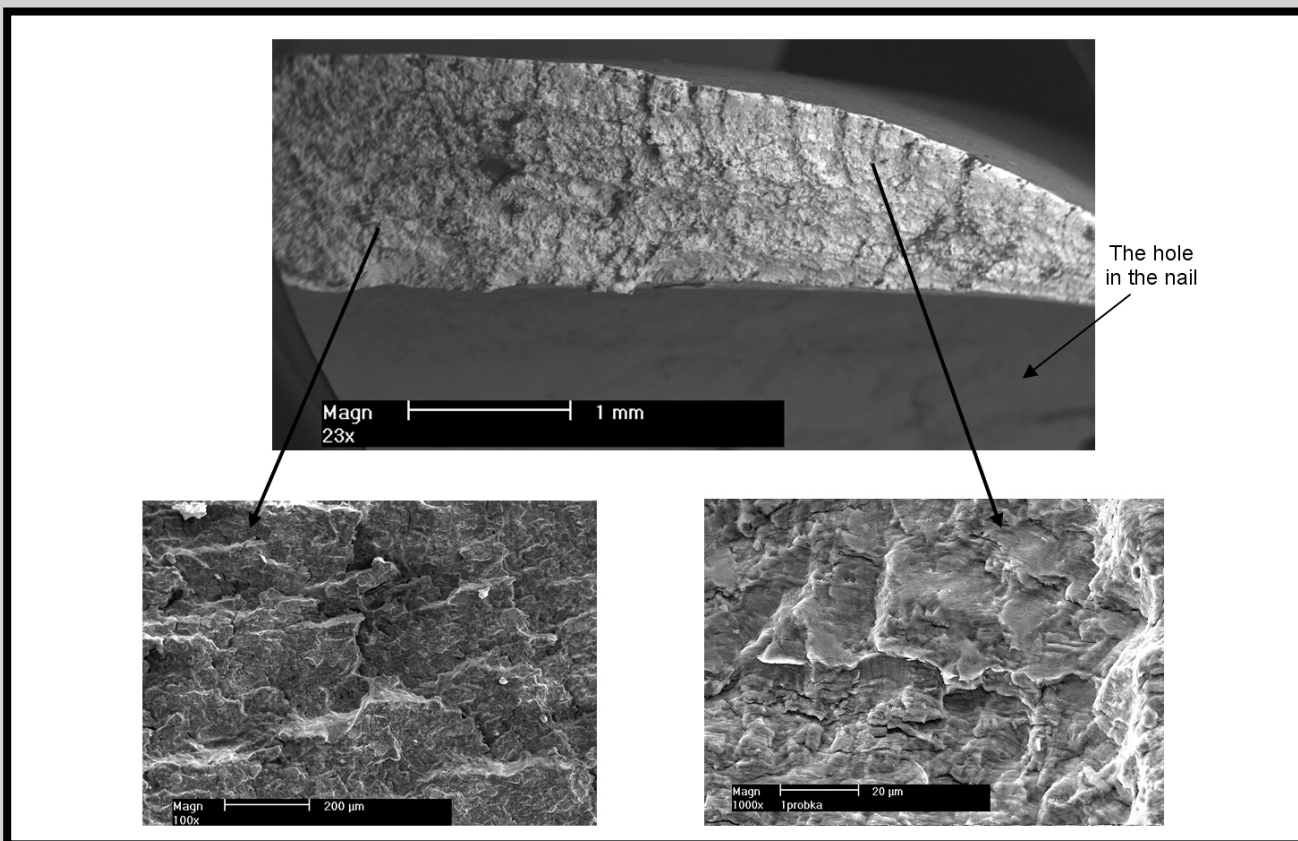


FIG. 7. View of the fatigue fracture of the Gamma nail.

Summary and conclusions

In this study it was found that:

1. The nails were made of Cr-Ni-Mo stainless steel and titanium alloy, commonly used in trauma surgery.
2. The failure of the Gamma nail showed the fatigue nature.
3. The fatigue fracture was initiated in the whole edge at the contact with the screw. The screw, which connects the nail with the bone was probably too tightly fastened, which resulted in the change of tension, causing the break of the nail.
4. During the rehabilitation period patients should absolutely adhere to doctor's instructions, dealing with moving and loading a broken bone that was stabilized with the Gamma nail.
5. The osteosynthesis methods with the use of metal implants carry different risks (inflammation, necrosis of the tissues). The aim is to achieve the best compatibility between the implant and the body, as well as the endurance in the environment in body fluids.

References

- [1] Marciniak J.: Biomaterials. Silesian Technical University Publishing House, Gliwice 2002.
- [2] Marciniak J.: Biomaterials in bone surgery. Silesian Technical University Publishing House, Gliwice 1992.
- [3] Marciniak J., Paszenda Z.: The biotolerance of metallic biomaterials. Red. L.F. Ciupik, D. Zarzycki, Polish Group DERO, The Society of Spine Research (2004) 133-142.
- [4] Skalak R.: Handbook of Bioengineering, S. Chien, New York 1986.
- [5] Long M., Rack H.J.: Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective, Biomaterials 19 (1998).
- [6] Pawlicki A.: The basis of medical engineering, Warsaw Technical University Publishing House, Warsaw 1997.
- [7] Kamachi Mudali U., Sridhar T.M., Raj B.: Corrosion of bio implants, Sadhana vol. 28, parts 3-4, June/August 2003.
- [8] Hoepfner D. W., Chandrasekaran V.: Fretting in orthopaedic implants, Department of Mechanical Engineering, USA 1993.
- [9] Sharan D.: The problem of corrosion in orthopedic implant materials, IndiaOrth, Orthopedic Update vol. 9, No. 1, April 1999.
- [10] Świerczyńska-Machura D., Kieć-Świerczyńska M., Kręcisz B., Pałczyński C.: The allergies to implant compounds, Allergy, Astma, Immunol. 9 (2004) 128-32.
- [11] Steinmann S.: Corrosion of surgical implants – in vivo, in vitro test, Advances in Biomaterials, Chirchester 1980.
- [12] Mears D. C.: International Metals Reviews, Review 218, June 1977, 119.
- [13] Geschwend N.: Allergologische Probleme in der Orthopädie, Orthop. (1977) 193-196.
- [14] Schnegg A.: Allergologische Probleme in der Orthopädie, Probleme in der Orthopädie., Z. Tierphysiol, 1970.
- [15] Hallab N.J., Merritt K., Jacobs J.: Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants, Bone Joint Surg. (2001) 428-436.
- [16] Dobrzański L.A., Brytan Z., Grande M.A., Rosso M., Pallavicini E.J.: Properties of vacuum sintered duplex stainless steels. J. Mat. Process. Techn., 162-163 (2005) 286-292.

BADANIA MIKROSKOPOWE WŁÓKIEN Z POLILAKTYDU OTRZYMANÝCH TECHNIKĄ ELEKTROPRZĘDZENIA JAKO MATERIAŁÓW NA RUSZTOWANIA KOMÓRKOWE DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

ANNA SOCHA^{1*}, MARTA BŁAŻEWICZ¹

¹ AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
* E-MAIL: ASOCHA@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Kość jest tkanką pełniącą bardzo ważną rolę w organizmie ludzkim, np. podczas poruszania się czy jako ochrona narządów wewnętrznych. Dzięki dużym zdolnościom regeneracyjnym tkanki kostnej, jej drobne uszkodzenia mogą samoistnie ulec wyleczeniu. Jednakże w przypadku poważniejszych urazów interwencja chirurgiczna staje się konieczna. Mając na uwadze liczne wady tego rozwiązania, w ostatnim czasie na znaczeniu zyskało podejście alternatywne, polegające na zastosowaniu rusztowań komórkowych do regeneracji tkanki kostnej.

Celem wspomnianego postępowania jest stworzenie trójwymiarowej struktury umożliwiającej i wspomagającej regenerację tkanki kostnej. Ponieważ struktury porowate otrzymywane w wyniku elektroprzędzenia swoją budową przypominają naturalną kość, stanowią one idealne środowisko do wysiania i namnożenia komórek.

W niniejszej pracy, wykorzystując technikę elektroprzędzenia, otrzymano włókna z polilaktydu (PLA) jako materiał na rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki kostnej. Ponadto zbadano wpływ takich parametrów procesu jak skład rozpuszczalnika, stężenie polimeru czy dodatek soli na strukturę otrzymywanych włókien. W celu polepszenia właściwości mechanicznych potencjalnych rusztowań komórkowych, otrzymano także nanokompozytowe włókna z PLA z dodatkiem sfunkcjonalizowanych wielowarstwowych nanorurek węglowych (MWCNT). Uzyskane struktury były badane przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Słowa kluczowe: inżynieria tkanki kostnej, rusztowania komórkowe, PLA, CNT

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 12-17]

Wprowadzenie

Kość stanowi tkankę pełniącą bardzo ważną funkcję w poruszaniu się, utrzymywaniu prawidłowej postawy ciała oraz ochronie narządów wewnętrznych [1]. Poprzez magazynowanie jonów wapnia i fosforu, tkanka kostna odpowiada także za utrzymanie homeostazy w organizmie. Dzięki dużym zdolnościom regeneracyjnym tkanki kostnej, jej drobne uszkodzenia mogą samoistnie ulec wyleczeniu [2].

MICROSCOPIC STUDIES OF POLYLACTIDE ELECTROSPUN FIBRES DESIGNED FOR TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS

ANNA SOCHA^{1*}, MARTA BŁAŻEWICZ¹

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND
* E-MAIL: ASOCHA@AGH.EDU.PL

Abstract

Bone is a tissue playing crucial role in human body, e.g., during locomotion or by protecting the internal organs. Thanks to bone's high regenerative capacity, its minor injuries may be spontaneously healed. Larger bone defects however need surgical intervention. Considering numerous disadvantages characterising this approach, bone tissue engineered scaffolds have recently gained considerable interest. Its aim is to design a 3D structure which will enable and promote bone regeneration. As porous structures obtained by electrospinning resemble natural bone, they represent a perfect environment for cell attachment and proliferation.

In this work polylactide (PLA) nanofibres were electrospun in order to create a scaffold for bone regeneration. The influence of parameters such as solvent composition, polymer concentration or salt addition on the morphology of the electrospun fibres was investigated in this work. In order to improve scaffold's mechanical properties we manufactured a nanocomposite of PLA and functionalized multiwall carbon nanotubes (MWCNT) using electrospinning technique as well. The obtained scaffolds were examined using scanning electron microscope (SEM).

Keywords: bone tissue engineering, scaffolds, PLA, CNT

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 12-17]

Introduction

Bone is a tissue playing crucial role in locomotion, maintaining proper posture of a body and protecting its internal organs [1]. By storing calcium and phosphate ions, bone is also involved in homeostasis. Thanks to its high regenerative capacity, some minor injuries may be spontaneously healed [2]. However, larger bone defects, resulting from e.g. tumor resections or severe fractures, need surgical intervention. Currently, the standard procedure in these cases is the autografting. i.e., the harvest of patient's healthy "donor" bone followed by its transplantation into the defected area. Although this procedure is very successful, its use is severely limited due to its short supply and possible morbidity of the patient's "donor" site. As a consequence of these limitations, bone tissue engineering scaffolds have recently gained considerable interest [2]. Its aim is to design a 3D structure which will enable and promote bone regeneration and, over time, will be resorbed and replaced by a newly regenerated tissue. Among numerous methods of scaffolds' engineering, electrospinning has gained a major attention [3].

Jednakże w przypadku rozleglejszych urazów i ubytków, powstałych w wyniku np. resekcji guzów czy złamań, staje się konieczna interwencja chirurgiczna. Obecnie standardową procedurę we wspomnianych przypadkach stanowi autoprzyszczep tzn. pobranie od pacjenta fragmentu nieuszkodzonej kości i umieszczenie go w zdefektowanym obszarze. Pomimo wysokiej skuteczności tej metody, zakres jej zastosowania jest ograniczony z uwagi na trudności w uzyskaniu dostatecznej ilości materiału kostnego do przeszczepu oraz możliwość wystąpienia martwicy w tym obszarze. W odpowiedzi na wspomniane trudności, na znaczeniu w ostatnim czasie zyskało zastosowanie rusztowań komórkowych do regeneracji tkanki kostnej [2]. Celem wspomnianego postępowania jest stworzenie trójwymiarowej struktury umożliwiającej i wspomagającej regenerację tkanki kostnej, która wraz z upływem czasu uległaby resorpcji i zastąpieniu przez zregenerowaną tkankę. Jedną z najbardziej obiecujących metod wytwarzania podłoży do regeneracji tkanki kostnej jest metoda elektroprzędzenia [3]. Ta niezwykle wszechstronna technika pozwala w bardzo prosty sposób otrzymać mikro- i nanowłókna polimerowe z ich roztworów lub stopów [4], którym można nadawać biomimetyczną przestrzenną strukturę. Ponieważ włókniste podłoża, otrzymywane w wyniku elektroprzędzenia przypominają swoją budową naturalną kość, stanowią idealne środowisko do wysiewania i namnażania komórek. W konsekwencji tego typu materiały świetnie nadają się do celów inżynierii tkanki kostnej [3]. Co więcej, w porównaniu do innych metod otrzymywania rusztowań komórkowych, jak samoorganizacja czy separacja fazowa, elektroprzędzenie jest techniką prostszą i mniej kosztowną [5].

W opisywanej pracy prowadzono proces elektroprzędzenia nanowłókien z poli(kwasu mlekowego) (PLA) w celu uzyskania trójwymiarowego układu, mogącego znaleźć zastosowanie jako materiał na rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki kostnej. Wybór użytego polimeru został podyktowany jego pożądanymi właściwościami w świetle planowanego zastosowania biologicznego tj. biokompatybilnością, biodegradowalnością oraz zadowalającymi właściwościami mechanicznymi [6]. Materiały polilaktydowe są obecnie powszechnie stosowane w inżynierii materiałów medycznych. Ze względu na to, iż jednym z parametrów podłoży, stosowanych do regeneracji tkanki kostnej, są ich parametry mechaniczne, część włókien wytwarzanych w metodzie elektroprzędzenia, zmodyfikowano nanorurkami węglowym. Modyfikacja nanorurkami węglowymi to nie tylko droga pozwalająca na uzyskanie materiału o wyższych parametrach mechanicznych, ale zarazem metoda poprawienia ich właściwości osteogennych [7-9]. Włókna z PLA zmodyfikowano wprowadzając niewielkie ilości sfunkcjonalizowanych wielowarstwowych nanorurek węglowych (MWCNT). Uzyskane tą drogą włókna były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).

Materiały i metody

W celu uzyskania włókien z PLA metodą elektroprzędzenia, sporządzono serie roztworów polimeru o różnym składzie. Stosowane stężenia polilaktydu (Ingeo™ Biopolymer 3251D) były równe 7, 10 oraz 15% wag./obj. Do sporządzenia roztworów użyto chloroformu (POCH, czysty), dichlorometanu (DCM) (POCH, czysty), metanolu (MeOH) (POCH, cz. d. a.) i N,N-dimetyloformamidu (DMF) (POCH, cz. d. a.). W przypadku dodatku soli do roztworu polimeru używano chlorku sodu (NaCl) (LACHNER, cz. d. a.). Na jednym z etapów prowadzonych badań do roztworów PLA wprowadzano także sfunkcjonalizowane wielowarstwowe nanorurki węglowe (MWCNT) w formie zdyspergowanej w DMF [10] (0,03 g/ml).

This widespread technique enables to produce easily micro- and nanofibres from polymeric solutions and melts [4] organized in a wide range of architectures. As porous structures obtained by electrospinning resemble fibrous structures naturally occurring in a body, e.g. natural bone, they represent a perfect environment for cell attachment and proliferation, thus this technique suits perfectly for bone tissue engineering [3]. What is more, compared with other tissue engineering methods, like self-assembly or phase separation techniques, electrospinning constitutes a simpler and less expensive way of producing tissue engineering scaffolds [5].

In this work poly(lactic acid) (PLA) nanofibres were electrospun in order to create 3D structure of the bone tissue regeneration scaffold. The choice of the polymer being used was supported by its suitable properties like biocompatibility, resorbability in living system, and suitable mechanical properties (strength, Young's modulus) [6]. Polylactide-based materials are widely used for biomedical applications. As a substrate for scaffolds, polylactide mechanical properties are crucial when intended to be used during bone regeneration process [7]. In order to improve mechanical properties of PLA [8], as well as increase osteoblast adhesion and promote their functions [9], we manufactured its nanocomposite by modification with the use of functionalized multiwall carbon nanotubes (MWCNT). Obtained scaffolds were examined using scanning electron microscope (SEM).

Materials and Methods

In order to obtain PLA nanofibres by electrospinning method series of polymer solutions were prepared. Polylactide (Ingeo™ Biopolymer 3251D) concentrations were 7, 10, and 15% wt/v. The solvents used were chloroform (POCH, pure grade), dichloromethane (DCM) (POCH, pure grade), methanol (MeOH) (POCH, analytical grade) and N,N-dimethylformamide (DMF) (POCH, analytical grade). The salt added to some PLA solutions was the sodium chloride (NaCl) from LACHNER (analytical grade). In one of the parts of the experiment, functionalized multiwall carbon nanotubes' (MWCNTs) suspension in DMF [10] (0.03 g/ml) was added into polymer solution.

For the electrospinning process, a simple device was used (FIG. 1). A 10 ml syringe, ended with a 0.6 x 30 mm needle, was loaded with the polymer solution. The voltage range to 6 kV was applied between the needle tip and the collector – rotating copper disc covered with the grounded aluminum foil. The tip-to-collector distance was being changed between 5 and 1 cm.

Obtained samples were analyzed using scanning electron microscope, SEM (Nova NanoSEM, FEI with EDS analyzer).

Results and Discussion

In the first part of the experiments there were applied the process conditions and parameters elaborated in our previous work and described elsewhere [12]. PLA nanofibres were electrospun from the PLA polymer solved in DCM/DMF (2/3 wt). Polymer solution concentration, solvent composition and the tip-to-collector distance were controlled and optimized. A series of the experiments were performed in order to develop a repetitive way of obtaining PLA fibres via electrospinning [17-20]. The experimental conditions of electrospinning process are listed in the TABLE 1. SEM images of the obtained structures are presented in FIGs. 2-4.

Proces elektroprzędzenia prowadzono w układzie przedstawionym na RYS. 1. Strzykawkę o pojemności 10 ml i zakończoną igłą o wymiarach 0,6 x 30 mm napełniano roztworem polimeru. Następnie między igłą a kolektorem – wirującym miedzianym dyskiem pokrytym folią aluminiową, przykładano napięcie z zakresu 0-6 kV. Odległość między igłą a miedzianą płytką była zmieniana w zakresie od 1 do 5 cm.

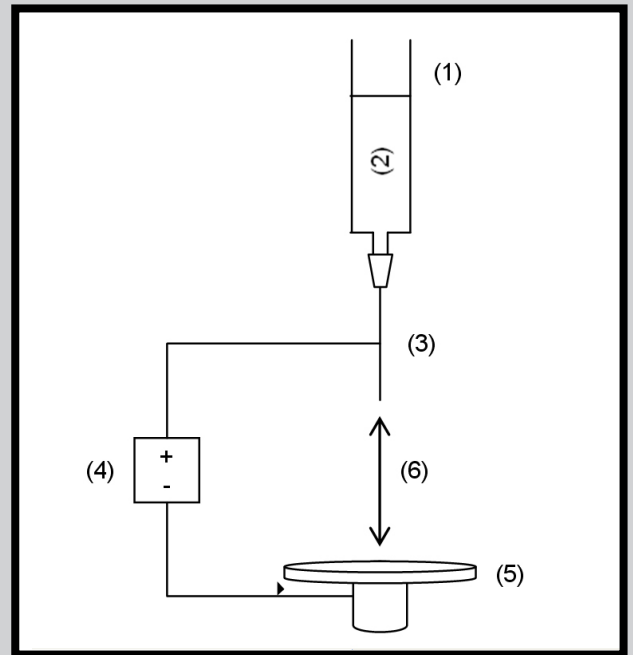
Uzyskane materiały były następnie badane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, SEM (Nova NanoSEM, FEI z wbudowanym analizatorem EDS).

Wyniki i dyskusja

W pierwszej części prowadzonych badań, zastosowano warunki elektroprzędzenia ustalone podczas wcześniej prowadzonych doświadczeń [12]. Włókna z PLA uzyskano z roztworu polimeru sporządzonego w DCM/DMF (2/3 wag). Stężenie polimeru w roztworze, skład rozpuszczalnika oraz odległość igła-kolektor były w ścisły sposób kontrolowane i optymalizowane. Następnie przeprowadzono serię doświadczeń w celu opracowania procedury elektroprzędzenia włókien polilaktydowych o powtarzalnej morfologii [17-20]. Warunki eksperymentalne procesu zostały zestawione w TABELI 1. Zdjęcia SEM uzyskanych struktur zamieszczono na RYS. 2-4.

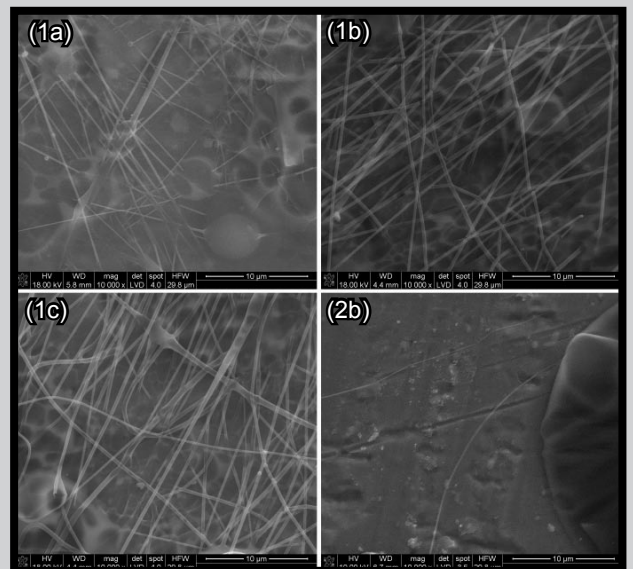
TABELA 1. Roztwory PLA oraz parametry procesu elektroprzędzenia wykorzystane w celu optymalizacji otrzymywania włókien polimerowych.
TABLE 1. PLA solutions and electrospinning parameters used to optimize nanofibres' formation.

Stężenie PLA [% wag./obj.] PLA concentration [% wt/v]	Skład rozpuszczalnika [wag.] Solvent composition [wt ratio]	Dodatek soli (NaCl) [% wag.] Salt (NaCl) addition [wt%]	Współczynnik lepkości dynamicznej Dynamic viscosity [mPa·s]
10	CHCl ₃	-	20.12
7	DCM/MeOH (4/1)	-	1.42
10	DCM/ MeOH (4/1)	-	3.86
15	DCM/ MeOH (4/1)	-	12.49
7	DCM/ MeOH (4/1)	1.0	1.39
10	DCM/ MeOH (4/1)	1.0	3.51
15	DCM/ MeOH (4/1)	1.0	12.12
7	DCM/DMF (2/3)	-	3.15
10	DCM/DMF (2/3)	-	9.08
15	DCM/DMF (2/3)	-	-
7	DCM/DMF (3/2)	-	1.82
10	DCM/DMF (3/2)	-	5.72
15	DCM/DMF (3/2)	-	23.42
7	DCM/DMF (3/2)	0.1	1.69
10	DCM/DMF (3/2)	0.1	4.59
15	DCM/DMF (3/2)	0.1	19.80
7	DCM/DMF (3/1)	-	1.90
10	DCM/DMF (3/1)	-	4.96
15	DCM/DMF (3/1)	-	17.74
7	DCM/DMF (3/1)	0.1	1.47
10	DCM/DMF (3/1)	0.1	3.97
15	DCM/DMF (3/1)	0.1	13.89
7	DCM/DMF (4/1)	-	1.69
10	DCM/DMF (4/1)	-	4.50
15	DCM/DMF (4/1)	-	15.97



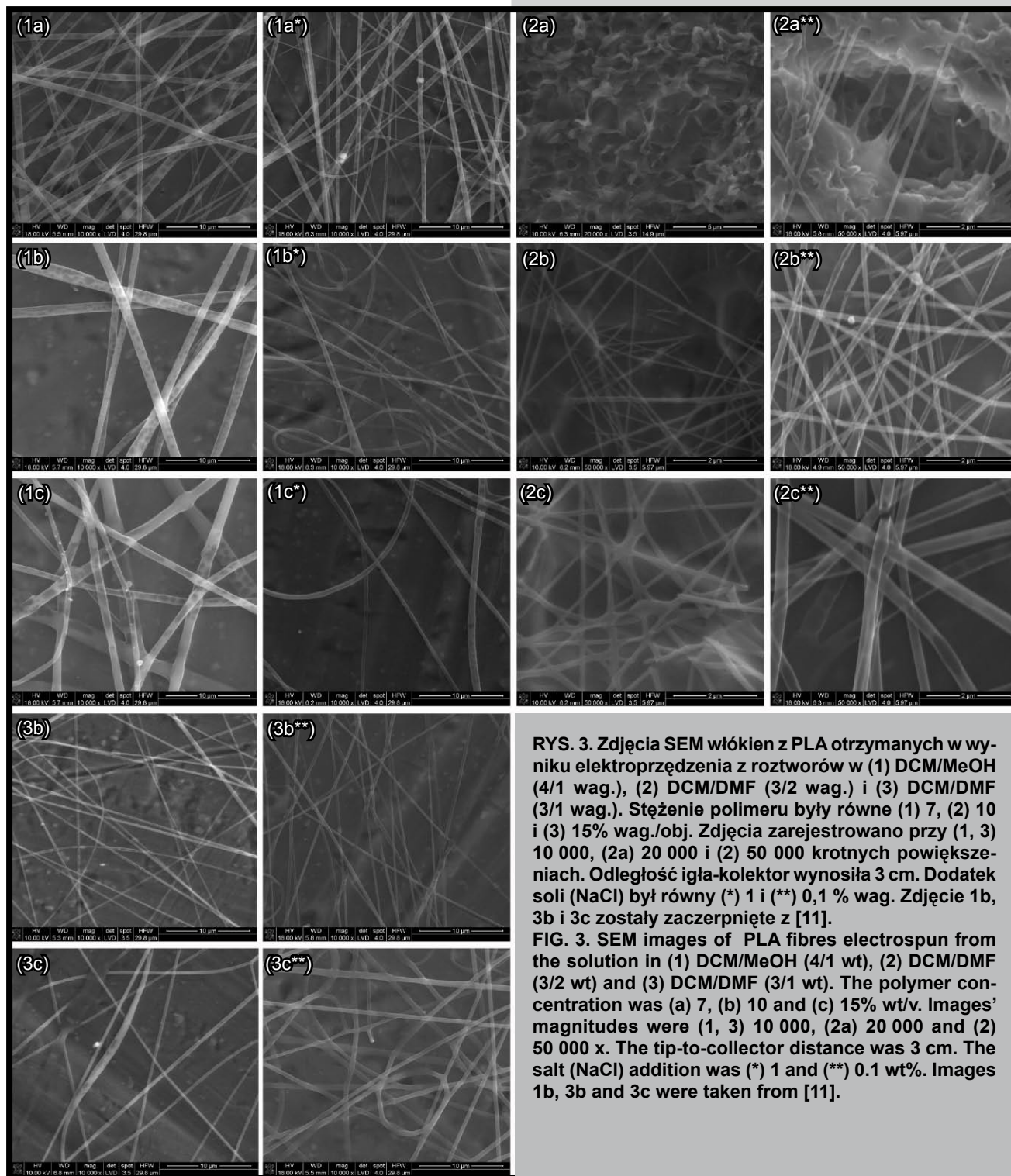
RYS. 1. Układ doświadczalny służący do przeprowadzania procesu elektroprzędzenia [11]: (1) strzykawka, (2) roztwór polimeru, (3) igła, (4) zasilacz, (5) wirujący kolektor oraz (6) odległość igła-kolektor.

FIG. 1. Experimental setup used in the electrospinning process [11]: (1) syringe, (2) polymer solution, (3) needle, (4) power supply, (5) rotating collector, and (6) tip-to-collector distance.



RYS. 2. Zdjęcia SEM włókien z PLA otrzymanych w wyniku elektroprzędzenia z roztworów w (1) DCM/DMF (4/1 wag.) i (2) CHCl₃. Stężenie polimeru były równe (1) 7, (2) 10 i (3) 15% wag./obj. Zdjęcia zarejestrowano przy 10 000 krotnym powiększeniu. Odległość igła-kolektor wynosiła 3 cm. Zdjęcia 1b i 2b zostały zaczerpnięte z [11].

FIG. 2. SEM images of PLA fibres electrospun from the solution in (1) DCM/DMF (4/1 wt) and (2) CHCl₃. The polymer concentration was (a) 7, (b) 10 and (c) 15% wt/v. Images' magnitudes were 10 000 x. The tip-to-collector distance was 3 cm. Images 1b and 2b were taken from [11].

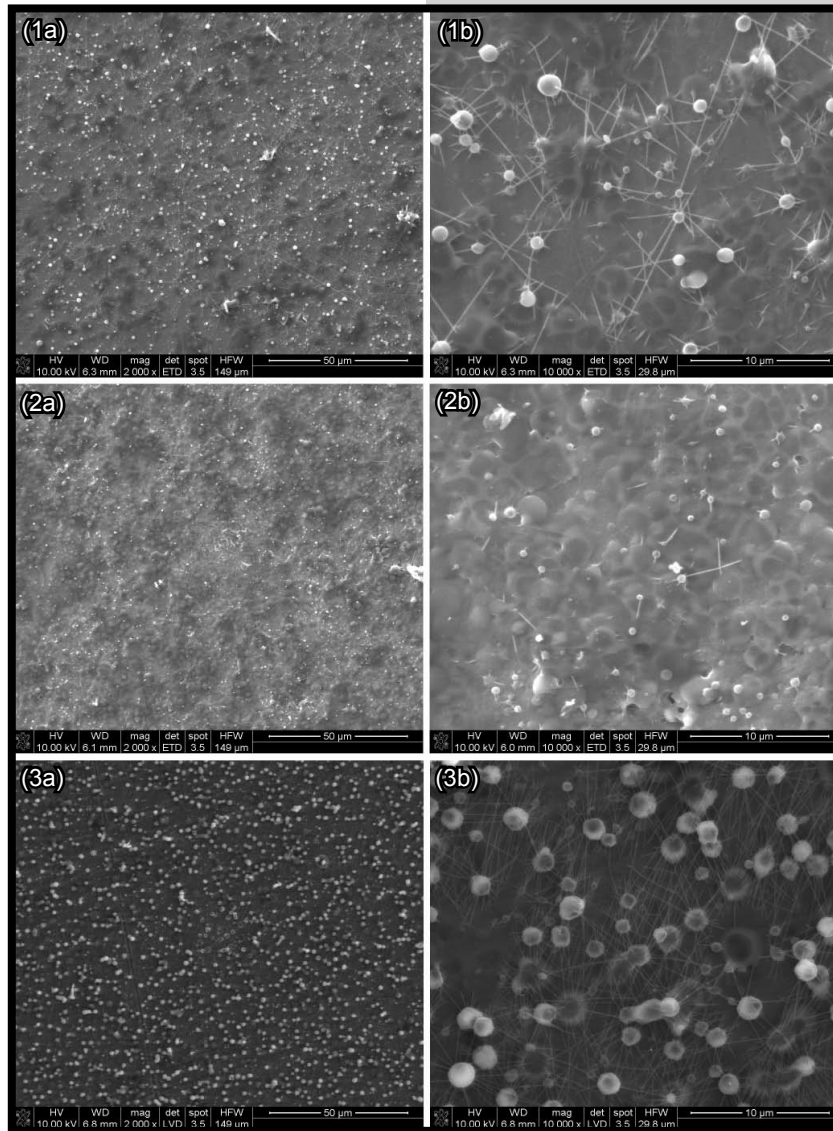


RYS. 3. Zdjęcia SEM włókien z PLA otrzymanych w wyniku elektroprzędzenia z roztworów w (1) DCM/MeOH (4/1 wag.), (2) DCM/DMF (3/2 wag.) i (3) DCM/DMF (3/1 wag.). Stężenie polimeru były równe (1) 7, (2) 10 i (3) 15% wag./obj. Zdjęcia zarejestrowano przy (1, 3) 10 000, (2a) 20 000 i (2) 50 000 krotnych powiększeniach. Odległość igła-kolektor wynosiła 3 cm. Dodatek soli (NaCl) był równy (*) 1 i (**) 0,1 % wag. Zdjęcie 1b, 3b i 3c zostały zaczerpnięte z [11].

FIG. 3. SEM images of PLA fibres electrospun from the solution in (1) DCM/MeOH (4/1 wt), (2) DCM/DMF (3/2 wt) and (3) DCM/DMF (3/1 wt). The polymer concentration was (a) 7, (b) 10 and (c) 15% wt/v. Images' magnitudes were (1, 3) 10 000, (2a) 20 000 and (2) 50 000 x. The tip-to-collector distance was 3 cm. The salt (NaCl) addition was (*) 1 and (**) 0.1 wt%. Images 1b, 3b and 3c were taken from [11].

Analizując zdjęcia SEM materiałów otrzymanych w procesie elektroprzędzenia można stwierdzić, że najbardziej obiecujące wyniki uzyskano w wyniku procesu prowadzonego przy wykorzystaniu roztworów sporządzonych w DCM. Fakt ten można wytłumaczyć dobrą rozpuszczalnością poli(kwasu mlekowego) we chlorowcopochodnych rozpuszczalnikach organicznych [6]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi [21-23] dodatek DMF do roztworu polimeru ułatwia przebieg elektroprzędzenia i skutkuje uzyskaniem jednolitych włókien. Wnioski te znalazły potwierdzenie w wynikach przeprowadzonych badań. Zaobserwowano ponadto, że stosując stosunkowo wysokie stężenia polimeru (rzędu 10-15% wag./obj.) uzyskiwano jednorodne i dobrze wykształcone włókna, co znalazło potwierdzenie w literaturze [4-5,13-16].

After the analysis of the SEM images it can be concluded, that the most advantageous results were obtained for the PLA fibres electrospun from the DCM solutions. Since poly(lactic acid) is well soluble in the chlorinated organic solvents [6], this conclusion is not surprising. As it was mentioned in the works [21-23], the DMF addition into the solution facilitates the electrospinning process and results in uniform nanofibres, what was observed in our experiment. A more uniform nanofibre structures were also obtained from the more concentrated PLA solutions (10-15% wt/v) which is in agreement with other results published in papers [4-5,13-16].



RYS. 4. Zdjęcia SEM włókien z PLA otrzymanych w wyniku elektroprzędzenia z roztworów w DCM/DMF (2/3 wag) z 1,5% wag. dodatkiem MWCNT [11]. Stężenie polimeru były równe (1) 7, (2) 10 i (3) 15% wag./obj. Zdjęcia zarejestrowano przy (a) 2 000 i (b) 10 000 krotnych powiększeniach. Odległość igła-kolektor wynosiła 2,5 cm.

FIG. 4. SEM images of PLA fibres electrospun from the solution in DCM/DMF (2/3 wt) with the 1.5 wt% addition of MWCNTs [11]. The polymer concentration was as follows: (1) 7, (2) 10 and (3) 15% wt/v. Images' magnitudes were (a) 2 000 and (b) 10 000 x. The tip-to-collector distance was 2.5 cm.

W toku prowadzonej pracy badano także wpływ dodatku soli (NaCl) do roztworu polimeru [19] na struktury uzyskiwane w wyniku elektroprzędzenia. Doświadczenia wykazały, że nawet niewielki dodatek soli (ograniczony przez słabą rozpuszczalność NaCl w MeOH i DMF) w ogólności ułatwia zachodzenie procesu (RYS. 3). Skutkuje on ponadto otrzymywaniem dobrze wykształconych i cienkich włókien. Jednakże wydajność procesu znacząco spada, wynika to zapewne ze zmian właściwości fizycznych roztworu PLA, następujących w wyniku wprowadzenia do niego NaCl.

W kolejnej części prowadzonych badań wytwarzano włókna z PLA z 1,5% wag. dodatkiem MWCNT (RYS. 4). Materiał w formie włókien zostały otrzymane dla wszystkich trzech stężeń polimeru. Zaobserwowano ponadto, że wraz ze wzrostem stężenia PLA uzyskiwano większe ilości bardziej jednorodnych włókien. Stwierdzono jednakże obecność zgrubień w miejscach przecięcia włókien polimerowych, co najprawdopodobniej zostało spowodowane agregacją nanorurek węglowych we wspomnianych obszarach.

The influence of salt (NaCl) addition [19] into the polymer solution was investigated as well. It occurred that even small amounts of salt (limited by its solubility in MeOH and DMF) facilitate the process (FIG. 3). It also helps in obtaining well-formed and thinner fibres. However, the yield of their formation was distinctly lower and less fibres were obtained. Moreover, after NaCl addition the PLA solutions' physical properties have changed and the electrospinning was more difficult to perform using the experimental setup available.

In the following part of the experiment, PLA nanofibres with the 1.5 wt% addition of MWCNTs were electrospun (FIG. 4). The obtained fibrous nanostructures were fibre-shaped. For the all three polymer concentrations used, nanofibres were successfully obtained. The higher PLA concentration was, the more and the more uniform were the fibres formed. However, beads occurred in the sites of the weaved nanofibres probably as a consequence of CNTs accumulation.

Wnioski

Celem opisanej pracy było uzyskanie włókien polilaktydowych modyfikowanych wielowarstwowymi nanorurkami węglowymi przy użyciu techniki elektroprzędzenia. Na podstawie badań mikroskopowych zoptymalizowano proces elektrospiningu i ustalono warunki niezbędne dla otrzymywania jednorodnych włókien o powtarzalnych parametrach. Przeprowadzone badania dowiodły możliwości uzyskania włókien polimerowych w warunkach niskich napięć, nie więcej niż 6 kV. Nanokompozytowe włókna uzyskiwano poprzez bezpośredni dodatek ich zawiesiny do roztworu polimeru. Jest to metoda odmienna od tradycyjnego podejścia, polegającego na rozproszeniu CNT w obrębie polimeru w formie stałej i rozpuszczeniu takiego układu w rozpuszczalniku organicznym [24-26], a następnie elektroprzędzeniu.

Podziękowania

Niniejsza praca była wspierana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu nr N N507 463537.

Conclusions

The aim of the presented work was to manufacture polylactide fibres modified with multiwall carbon nanotubes using the electrospinning technique. Based on the SEM images of the obtained structures, the parameters of the process used were optimized in order to obtain uniform nanofibres. Performed experiments proved the possibility of electrospinning polymer nanofibres using a low-power supply, under 6 kV voltage. It has been also demonstrated that it is possible to add CNTs' suspension into the polymer solution, instead of having mixed them together with the polymer matrix and then dissolving [24-26], and electrospun the received composite.

Acknowledgements

This work has been supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, project no N N507 463537.

Piśmiennictwo

- [1] Stevens M.: Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 11 (2008) 18-25.
- [2] Stylios G., Wan T., Giannoudis P.: Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. *Injury: International Journal of the Care of the Injured* 38 (2007) S63-S74.
- [3] Di Martino A., Liverani L., Rainer A., Salvatore G., Trombetta M., Denaro V.: Electrospun scaffolds for bone tissue engineering. *Musculoskeletal Surgery* 95 (2011) 69-80.
- [4] Frenot A., Chronakis I.: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid Interface Science* 8 (2003) 64-75.
- [5] Pham Q., Sharma U., Mikos AG.: Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Engineering* 12 (2006) 1197-1211.
- [6] Garlotta D.: A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment* 9 (2001) 63-84.
- [7] Torres-Giner S., Gimeno-Alcaniz J., Ocio M., Lagaron J.: Optimization of Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers for Osteoconductive Bone Scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 914-925.
- [8] Yang T., Wu D., Lu L., Zhou W., Zhang M.: Electrospinning of Polylactide and Its Compositing With Carbon Nanotubes. *Polymer Composites* 32 (2011) 1280-1288.
- [9] Zhang L., Webster T.J.: Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4 (2009) 66-80.
- [10] Fraczek-Szczypta A., Menaszek E., Błażewicz S.: Some Observations on Carbon Nanotubes Susceptibility to Cell Phagocytosis. *Journal of Nanomaterials* 2011 (2011).
- [11] Socha A., Błażewicz M.: Electrospun fibers modified with MWCNT as scaffolds for bone tissue regeneration. *The Annual World Conference on Carbon June 17-22, 2012, Krakow, Poland, Program and Abstracts (ID 1089)*.
- [12] Stodolak-Zych E., Gora A., Zych L., Szumera M.: Bioactivity of fibrous Polymer Based Nanocomposites for Application in Regenerative Medicine. *Materials Science Forum* 714 (2012) 229-236.
- [13] Huang ZM., Zhang YZ., Kotaki M., Ramakrishna S.: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63 (2003) 2223-2253.
- [14] Teo WE., Inai R., Ramakrishna S.: Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Science and Technology of Advanced Materials* 12 (2011) 1-19.

References

- [15] Hohman M., Shin M., Rutledge G., Brenner M.: Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids* 12 (2001) 2201-2220.
- [16] Yarin A., Koombhongse S., Reneker D.: Tylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* 90 (2001) 4836-4846.
- [17] Kenawy ER., Bowlin G., Mansfield K., Layman J., Simpson D., Sanders E., Wnek G.: Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release* 81 (2002) 57-64.
- [18] Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S.: Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibers. *Nanotechnology* 16 (2005) 208-213.
- [19] Zong X., Kim K., Fang D., Ran S., Hsiao BS., Chu B.: Structure and process relationship of electrospun bioadsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 43 (2002) 4403-4412.
- [20] Wright L., Young R., Andric T., Freeman J.: Fabrication and mechanical characterization of 3D electrospun scaffolds for tissue engineering. *Biomedical Materials* 5 (2010) 055006 (9pp).
- [21] Lee KH., Kim HY., La YM., Lee DR., Sung NH.: Influence of a Mixing Solvent with Tetrahydrofuran and N,N-Dimethylformamide on Electrospun Poly(vinyl chloride) Nonwoven Mats. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 40 (2002) 2259-2268.
- [22] Lee KH., Kim HY., Khil MS., Ra YM., Lee DR.: Characterization of nano-structured poly(ϵ -caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. *Polymer* 44 (2003) 1287-1294.
- [23] Hsu CM., Shivkumar S.: N,N-Dimethylformamide Additions to the Solution for the Electrospinning of Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers. *Macromolecular Materials and Engineering* 289 (2004) 334-340.
- [24] Potschke P., Bhattacharyya A., Janke A., Pegel S., Leonhardt A., Taschner C., Ritschel M., Roth S., Hornbostel B., Cech J.: Melt Mixing as Method to Disperse Carbon Nanotubes into Thermoplastic Polymers. Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures 12 (2005) 211-224.
- [25] Wu D., Wu L., Zhang M., Zhao Y.: Viscoelasticity and thermal stability of polylactide composited with various functionalized carbon nanotubes. *Polymer Degradation and Stability* 93 (2008) 1577-1584.
- [26] Wu D., Wu L., Zhou W., Zhang M., Yang T.: Crystallization and Biodegradation of Polylactide/Carbon Nanotube Composites. *Polymer Engineering and Science* 50 (2010) 1721-1733.

WPŁYW NOSZENIA NA STRUKTURĘ WODY I DEHYDRACJĘ SILIKONOWO-HYDROŻELOWYCH SOCZEWEK KONTAKTOWYCH

KATARZYNA KRYSZTOFIAK*, MATEUSZ PŁUCISZ, ANDRZEJ SZYCZEWSKI

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNAŃU,
WYDZIAŁ FIZYKI, ZAKŁAD FIZYKI MEDYCZNEJ,
UL. UMULTOWSKA 85, 61-614 POZNAŃ

* E-MAIL: KRYSZTOK@AMU.EDU.PL

Streszczenie

Na zachowanie się miękkich soczewek kontaktowych na oku i ich komfort noszenia wpływa wiele czynników. Uwodnienie oraz struktura wody w polimerze decydują m.in. o ich właściwościach mechanicznych oraz transporcie przez soczewkę. Dehydratacja, która ma miejsce od momentu aplikacji soczewki na oko, może przyczynić się do obniżenia komfortu i jakości widzenia pacjenta. Dodatkowo, podczas noszenia zarówno na powierzchni jak i wewnątrz materiału mogą odkładać się zanieczyszczenia pochodzące z filmu łzowego. Celem badania była analiza *in vitro* zmian w strukturze wody oraz dynamice dehydratacji pojawiających się na skutek użytkowania w silikonowo-hydrożelowych soczewkach kontaktowych wyprodukowanych z materiału senofilcon A i ich zmian w czasie. Jak wskazują otrzymane wyniki, podczas noszenia dochodzi do obniżenia uwodnienia soczewek kontaktowych, a zawartość wody wolnej i luźno związanej spada o około połowę. Analiza współczynnika dehydratacji DR wskazuje, iż wraz ze zwiększaniem czasu noszenia odparowanie wody z materiału zachodzi wolniej i w mniejszym stopniu, niż dla soczewek nowych.

Słowa kluczowe: soczewki kontaktowe, hydrożele silikonowe, dehydratacja, struktura wody

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 18-25]

Wprowadzenie

Zrozumienie potrzeb fizjologicznych oka, a w szczególności rogówki, oraz znaczący postęp technologiczny doprowadziły do wprowadzania na rynek coraz to lepszych i bezpieczniejszych soczewek kontaktowych. Jednakże ta metoda korekcji wzroku nadal nie jest pozbawiona wad: umieszczone na oku, soczewki zawsze będą stanowiły pewną barierę dla tlenu, będą zaburzać prawidłową strukturę filmu łzowego, a spowodowane parowaniem wysychanie ich powierzchni może doprowadzić do uszkodzeń mechanicznych spojówki powiekowej.

Woda stanowi integralną część materiałów stosowanych w produkcji soczewek kontaktowych, stąd w stanie uwodnionym dochodzi do oddziaływania cząsteczek wody z łańcuchami polimerowymi. W wyniku tych oddziaływań woda zachowuje się inaczej niż zwykle, m.in. nie krystalizuje w temp. 0°C. Zgodnie z teorią dyskretną, zaproponowaną przez Pedley'a i Tighe [1] można mówić o istnieniu trzech różniących się termodynamicznie klasach wody:

(1) silnie związanej - tworzącej bezpośrednie wiązania wodorowe z grupami polarnymi lub silnie oddziałującej z resztami jonowymi, dlatego też nie wykazującej przejścia fazowego w pomiarze DSC;

THE INFLUENCE OF WEARING ON WATER STATES AND DEHYDRATION OF SILICONE-HYDROGEL CONTACT LENSES

KATARZYNA KRYSZTOFIAK*, MATEUSZ PŁUCISZ, ANDRZEJ SZYCZEWSKI

ADAM MICKIEWICZ UNIVERSITY IN POZNAŃ,
FACULTY OF PHYSICS, DIVISION OF MEDICAL PHYSICS,
UL. UMULTOWSKA 85, 61-614 POZNAŃ, POLAND

* E-MAIL: KRYSZTOK@AMU.EDU.PL

Abstract

The on-eye performance and wearing comfort of soft contact lenses may be influenced by many factors. Water content and its structure among the polymer decide e.g. on their mechanical and transport properties. Dehydration, which takes place immediately after lens application may lead to decrease in patient wearing comfort and quality of vision. Additionally, during wearing both on the surface and inside material the contaminants from the tear film can be accumulated. The purpose of this study was to examine the changes in water structure and dehydration patterns that may happen in silicone-hydrogel contact lenses made from senofilcon A as result of wearing. The results obtained have shown, that during wearing water content of these lenses decreases and the content of free and loosely bound water is reduced by about half. Dehydration factor DR analysis indicates that with increasing time of wearing water evaporates from the material more slowly and to a lesser extent than for the new ones.

Keywords: contact lenses, silicone-hydrogels, dehydration, water states

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 18-25]

Introduction

Understanding the physiological needs of the eye, particularly the cornea, as well as significant technological advances have led to produce better and safer contact lenses. However, this method of correction is still not free from drawbacks: placed on the eye, the lens will always constitute a barrier to oxygen, it will disrupt the proper structure of the tear film and the evaporation due to drying of the surface may lead to mechanical damage in eyelid conjunctiva.

Water is an integral part of the materials used in the contact lens manufacture. Hence, when hydrated, it comes to the interaction of water molecules with the polymer chains. As a result of this water behaves differently than usual, e.g. it does not crystallize at 0°C. According to the discrete model proposed by Pedley'a and Tighe [1] one can speak of the existence of three thermodynamically different classes of water:

(1) tightly bound - creates a direct hydrogen bonds with polar groups or strongly interacts with polymer ionic residues, therefore does not exhibit a phase transition in the DSC measurement;

(2) luźno związanej - tworzącej luźne wiązania wodorowe z materiałem, co powoduje, że woda ta zamarza w temperaturze niższej niż 0°C;

(3) wolnej - nie reagującej z macierzą polimeru, a co za tym idzie, zachowującą wszystkie cechy czystej wody.

Proces dehydratacji soczewki kontaktowej rozpoczyna się natychmiast po umieszczeniu jej na oku i trwa aż do uzyskania stanu równowagi, zależnie od materiału, z którego jest ona wyprodukowana, od środowiska oraz od właściwości filmu łzowego użytkownika [2-5]. Dyskomfort oraz uczucie suchości oczu są najczęściej zgłaszanymi przez pacjentów dolegliwościami związanymi z noszeniem soczewek kontaktowych [5,6], jednak jak dotąd nie stwierdzono, aby dehydratacja soczewek kontaktowych była bezpośrednim czynnikiem wywołującym Zespół Suchego Oka (ZSO) [7]. Mimo to, odparowywanie wody z miękkich soczewek kontaktowych jest problemem, który może przyczynić się do porzucania przez pacjentów soczewek kontaktowych, a ZSO jest stwierdzany znacznie częściej u osób noszących soczewki kontaktowe niż u pozostałej części populacji. Dotychczasowe badania wykazały, że objawy suchego oka zgłaszane są częściej przez użytkowników konwencjonalnych soczewek hydrożelowych i że mogą one ustąpić po zamianie na soczewki silikonowo-hydrożelowe [8]. Celem eksperymentu była analiza *in vitro* zmian zachodzących w tego typu soczewkach na skutek noszenia, mogących wpływać na komfort noszenia.

Materialy i metody

Badaniu poddano miękkie soczewki kontaktowe systematycznej wymiany przeznaczone do noszenia w trybie dwutygodniowym, wyprodukowane z silikonowo-hydrożelowego materiału senofilcon A, opartego na zmodyfikowanym monomerze Tanaki, w którym problem połączenia hydrofobowych silikonów z hydrofilowymi monomerami został rozwiązany poprzez dołączenie do TRIS (metakrylanu tris(trimetylosiloksy)silylopropylu) kilku jednostek zwiększających jego hydrofilowość [9]. Zgodnie z nomenklaturą FDA należą do I grupy soczewek kontaktowych, t.j. nisko uwodnionych jonowych. W skład materiału wchodzi HEMA (metakrylan 2-hydroksyetylu), PDMS (polidwumetylosiloksan), DMA (N,N-dwumetyloakrylamid) oraz PVP (poliwinylopyrolidon).

Metoda DSC została wykorzystana w celu określenia struktury wody w badanym materiale oraz monitorowania jej zmian, które zachodzą w wyniku normalnego użytkowania soczewek kontaktowych. Dla każdego czasu noszenia soczewka była badana jeden raz. W przypadku soczewek nowych próbkę najpierw osuszano delikatnie za pomocą bibuły, natomiast soczewki noszone mogły być mierzone z pominięciem tego etapu. Badanie przeprowadzono za pomocą różnicowego kalorymetru skaningowego DSC Q2000 (TA Instruments) w Wydziałowym Laboratorium Badań Strukturalnych na Wydziale Fizyki UAM w Poznaniu. Aby umożliwić analizę porównawczą z wynikami zaprezentowanymi wcześniej w literaturze [10, 11], program temperaturowy DSC dobrano w następujący sposób:

- chłodzenie próbki do temperatury -70°C w tempie 2,5°C/min
- utrzymywanie próbki w temperaturze -70°C przez 10 min
- ogrzewanie próbki do temperatury 20°C w tempie 2,5°C/min
- utrzymywanie próbki w temperaturze 20°C przez 5 min.

Ze względu na wielkość naczynia pomiarowego oraz na dokładność wyników do pomiaru DSC wykorzystywano jedynie niewielki fragment soczewki, ucięty za pomocą skalpela chirurgicznego.

(2) loosely bound - forms loose hydrogen bonds with the material, which makes this water freeze at temperatures lower than 0°C;

(3) free (bulk) - does not react with the polymer matrix, and thus, preserves all the qualities of clean water.

Contact lens dehydration starts immediately after placing it on the eye and continues until it reaches the steady state, depending on the material of which it is produced, the environment and the properties of the users tear film [2-5]. Discomfort and dryness are the most commonly reported by patients ailments associated with wearing contact lenses [5,6], but so far there is no evidence that contact lens dehydration could be a direct factor causing Dry Eye Syndrome (DES) [7]. Nevertheless, the evaporation of water from soft contact lenses is a problem that may contribute to the abandonment by the contact lens patients, and DES is far more common in contact lens wearers than in the rest of the population. Previous studies have shown that dry eye symptoms are reported more often by users of conventional hydrogel lenses, and they may disappear after conversion to silicone hydrogel lenses [8]. The aim of the experiment was an *in vitro* evaluation of the changes in this type of lenses that may happen as a result of wear, affecting patient comfort of wearing.

Materials and Methods

The study involved soft contact lenses for the systematic exchange designed to be worn in two weeks mode, made of senofilcon A, silicone-hydrogel material based on a modified Tanaka monomer, in which the problem of mixing of hydrophobic silicone with hydrophilic monomers was solved by attaching to TRIS (tris(trimethylsilyloxy)propyl methacrylate) a number of hydrophilic units, increasing its solubility [9]. According to the American FDA nomenclature it belongs to group I, i.e. low hydrated ionic. The material consists of HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate), PDMS (polydimethylsiloxane), DMA (N,N-dimethylacrylamide) and PVP (polyvinylpyrrolidone).

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to determine the structure of water in the material and to monitor changes in the water content and its structure due to normal use of contact lenses. For each measurement every contact lens was tested once. In the case of new lenses, lens was first dried gently with blotting paper to remove excess water from the lens surface, while the worn samples could be measured without this step. The study was conducted using DSC Q2000 (TA Instruments) in the Laboratory of Structural Research of the Faculty of Physics at the Adam Mickiewicz University. In order to allow a comparative analysis of the results presented previously in the literature [10,11], DSC temperature program were chosen as follows:

- cooling of the sample to a temperature -70°C at a rate of 2.5°C/min
- keeping the sample at -70°C for 10 min
- heating the sample to a temperature of 20°C at a rate of 2.5°C/min
- keeping the sample at 20°C for 5 min.

Due to the size of the cell and on the accuracy of the DSC results, a small piece of the material was cut with a scalpel.

In order to monitor changes that occur in the lenses as a result of use, measurements of new and after 3, 7, 10 and 14 days of wear (all with power -3.00 dptr) were conducted. Lenses were worn an average of 8-10 hours a day, and after removing from the eyes cleaned and disinfected overnight in multi-purpose contact lens solution. New lenses were tested immediately after taking out of the packaging.

W celu monitorowania zmian, które zachodzą wskutek użytkowania, pomiarom poddano zarówno soczewki nowe, jak i po 3, 7, 10 oraz 14 dniach noszenia (wszystkie o mocy -3,00 dptr). Soczewki były noszone średnio po 8-10 godzin dziennie, a po zdjęciu z oczu czyszczone i dezynfekowane przez noc w płynie wielofunkcyjnym. Soczewki nowe poddawano badaniu bezpośrednio po wyjęciu z opakowania handlowego, natomiast używane, by uniknąć wypłukiwania składników filmu łzowego, które osadziły się w materiale podczas noszenia, bezpośrednio po zdjęciu z oka.

Zastosowanie metody grawimetrycznej umożliwiło ocenę *in vitro* zmian w przebiegu dehydratacji zachodzących w badanych soczewkach w wyniku ich użytkowania. Soczewki badano przy użyciu wagi analitycznej, rejestrując co minutę zmianę ich masy w czasie z dokładnością do 0,1 mg. Pomiar zatrzymywano po uzyskaniu stałej masy próbki przez minimum 5 minut. Nowe soczewki przed rozpoczęciem pomiaru były lekko osuszane ze pomocą bibułki, by usunąć nadmiar cieczy obecny na ich powierzchni po wyjęciu z opakowania, natomiast używane umieszczano na wadze bezpośrednio po zdjęciu z oka. Próbki umieszczano na wypukłym plastikowym uchwycie o promieniu krzywizny zbliżonym do promienia krzywizny rogówki, tak aby odwodnienie następowało tylko z przedniej powierzchni soczewki, jak to ma miejsce w przypadku gdy znajduje się ona na oku. Dla każdego czasu noszenia pomiar powtarzano 2- lub 3-krotnie. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono współczynnik dehydratacji DR oraz uwodnienie (EWC) soczewek, co umożliwiło analizę jakościową, jak i ilościową przebiegu dehydratacji badanych próbek. Współczynnik DR obliczono w następujący sposób [12]:

$$DR = \frac{m_t - m_{t-1}}{m_t} \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie m_t – masa próbki w czasie t , m_{t-1} – masa próbki w czasie $(t-1)$. Parametr ten wyraża zmianę masy soczewki w danej chwili czasu. Uwodnienie wyznaczono korzystając z następującej zależności:

$$EWC = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie m_0 – średnia masa początkowa soczewki, m_f – średnia masa końcowa mierzonej soczewki.

Wyniki i dyskusja

Grawimetria

Jak widać na RYS. 1, użytkowanie soczewek kontaktowych początkowo (pierwsze 3 i 7 dni noszenia) powoduje znaczne obniżenie ich masy, a następnie (10 i 14 dzień użytkowania) dochodzi do jej zwiększenia. Prawdopodobnym wyjaśnieniem tego wyniku jest fakt, iż pomimo codziennego czyszczenia materiał absorbuje pewną ilość białek [10,11,13], które po pewnym czasie ulegają denaturacji, zatrzymując nieco więcej wody, co znajduje swoje odbicie w niewielkim (ok. 2 mg) zwiększeniu masy próbki.

Dodatkowo, na wykresie (RYS. 1) widać, iż zmienia się dynamika dehydratacji. Zmiana ta jest bardziej widoczna, gdy poddamy analizie wartości współczynnika dehydratacji DR. Na podstawie czasu potrzebnego do osiągnięcia DR -1,00%; -0,50% i -0,15% (TABELA 1) można wyróżnić trzy fazy dehydratacji. W I fazie utrata wody z materiału jest szybka, w fazie II odwodnienie następuje znacznie wolniej, a w fazie III dochodzi do ustabilizowania się masy próbki. Jak widać, już po pierwszych 3 dniach użytkowania dochodzi do skrócenia czasu trwania I i II fazy dehydratacji, co jest zgodne w wcześniejszymi badaniami [12].

Worn samples, to avoid leaching of the components of the tear film, which are deposited in the material during wear, were examined immediately after removal from the eye.

The use of gravimetric method enabled the *in vitro* evaluation of changes in the dehydration patterns occurring in the lenses studied. Examination was performed using an analytical balance, recording every minute the change of weight in time with an accuracy of 0,1 mg. The measurement was stopped after a constant weight of the sample for at least 5 minutes was gained. Before the measurement new lenses were carefully dried with a blotting paper to remove excess liquid and worn samples were placed on the balance immediately after removal from the eye. Samples were placed on a convex plastic holder with a radius of curvature similar to the radius of the cornea, so that evaporation followed only from the front surface of the lens, as it is when lens is placed on eye. For each time of wearing measurement was repeated 2 or 3 times. From the results obtained the rate of dehydration DR and water content (EWC) were calculated, which allowed the qualitative and quantitative analysis of dehydration of the lenses studied. DR was calculated as follows [12]:

$$DR = \frac{m_t - m_{t-1}}{m_t} \cdot 100\% \quad (1)$$

where m_t - weight of sample at time t , m_{t-1} - mass of sample at time $(t-1)$. This parameter expresses the change in mass of the lens at a given moment of time. Water content was determined using the following formula:

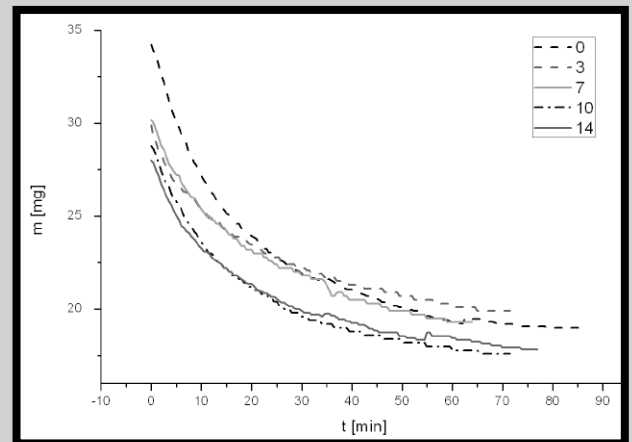
$$EWC = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \cdot 100\% \quad (2)$$

where m_0 - average initial mass of the lens, m_f - end of the measured average mass of the lens.

Results and Discussions

Gravimetry

As shown in FIG. 1, the use of contact lenses initially (first 3 and 7 days wear) causes a significant reduction in their weight and then (10 and 14 days of use) comes to its small increase. The probable explanation for this result is that, in spite of daily cleaning of the material, it absorbs a certain amount of proteins [10,11,13], which eventually undergo denaturation, binding a little more water, which is reflected in the small (about 2 mg) increase in weight of the samples.



RYS. 1. Przebieg dehydratacji w funkcji czasu dla poszczególnych czasów noszenia.

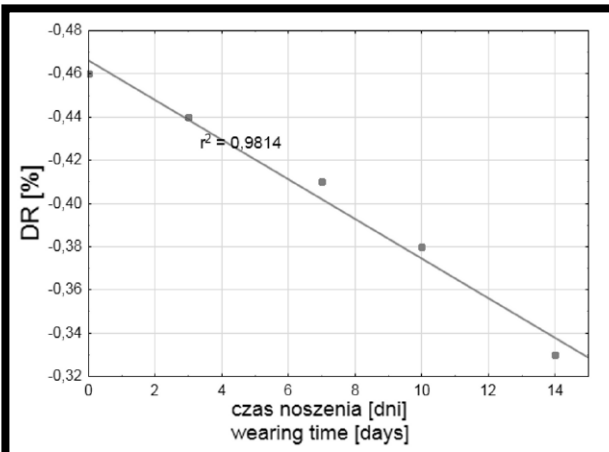
FIG. 1. Dehydration plotted in function of time for each time of wearing.

TABELA 1. Czas trwania dwóch pierwszych faz dehydratacji (faza trzecia trwa od końca fazy drugiej do zakończenia).
TABLE 1. The duration times of the first two stages of dehydration (the third phase lasts from the end of the second phase to the end of measurement).

czas noszenia [dni] wearing time [days]	0	3	7	10	14
I faza / I phase [min]	<16.5	<8.5	<11	<6.5	<6.5
II faza / II phase [min]	16.5-27.5	8.5-21.5	11-22	6.5-23.5	6.5-17.5

Możliwe, że jest to spowodowane zmniejszeniem uwodnienia badanych soczewek, a także zmianą proporcji wody wolnej i luźno związanej (patrz poniżej), do których dochodzi podczas użytkowania soczewek. Dodatkowo, występowanie opisanych powyżej trzech faz dehydratacji może być wynikiem istnienia trzech klas wody: w trakcie I fazy odparowuje woda wolna, której nie wiążą z materiałem żadne oddziaływania, stąd wysoka średnia wartość współczynnika DR; podczas II fazy z materiału odparowuje woda luźno i być może część wody silnie związanej, co możliwe jest dopiero po usunięciu z materiału wody wolnej; w III fazie prawdopodobnie odparowuje też część wody związanej, jednak ze względu na dużą siłę oddziaływania cząsteczek wody z polimerem proces ten zachodzi znacznie wolniej niż wcześniej (stąd niskie DR) i w opisanych wyżej warunkach laboratoryjnych prowadzi do ustalenia warunków równowagi nie usuwając jednak całkowicie wody z soczewki.

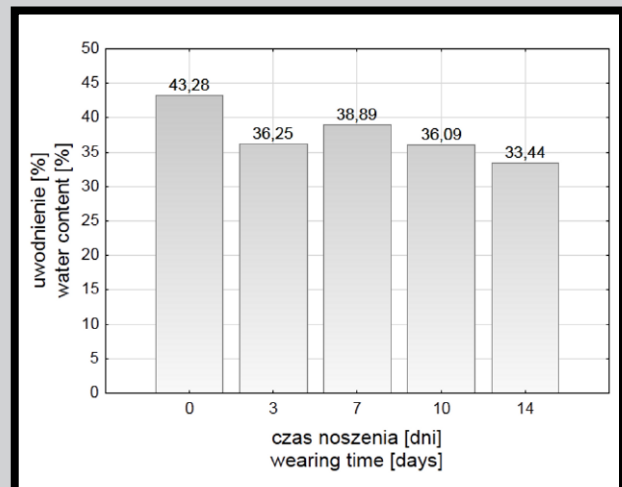
Co ciekawe, badania porównujące dehydratację soczewek nowych i noszonych [12] wykazały, iż po pełnym czasie noszenia (zależnie od przeznaczenia: 30 lub 15 dni) współczynnik DR dla wszystkich badanych materiałów ulegał zwiększeniu. W przypadku badanych przez nas soczewek współczynnik DR maleje wraz ze zwiększaniem czasu noszenia (RYS. 2) i osiąga swoją najniższą wartość po upływie 14 dni od rozpoczęcia noszenia. Wynik ten może być spowodowany faktem, iż wraz ze zwiększaniem czasu użytkowania maleje uwodnienie badanych soczewek (RYS. 3), co wykazała zarówno grawimetria jak i pomiar DSC. Kolejnym czynnikiem wpływającym na zmiany w dynamice dehydratacji może być zmniejszenie ilości wody wolnej zawartej w polimerze, będące prawdopodobnie skutkiem odkładania się i denaturacji białek [10,11]. Pojawiające się w wyniku odparowywania wody suche (hydrofobowe) obszary mogą przyczynić się do zwiększania adsorpcji na powierzchni soczewek kontaktowych, dodatkowo przyczyniając się do zwiększenia dehydratacji.



RYS. 2. Zależność wartości średniej współczynnika DR od czasu noszenia.
FIG. 2. DR versus time of wearing.

In addition, the diagram (FIG. 1) shows changes in the dynamics of dehydration. This is more evident when we analyze the dehydration rate DR. Based on the time needed to achieve DR -1.00%, -0.50% and -0.15% (TABLE 1) the process of dehydration can be divided into three phases. In the first phase loss of water from the material is fast; in the second phase dehydration goes more slowly and in the third one it comes to the stabilization of its mass and sample reaches its equilibrium. As seen, after the first 3 days of use it comes to the shortening in the duration times of I and II phase of dehydration, which is in accordance with previous studies [12]. It is possible that this is caused by decrease in water content of lenses studied and also by change in the proportion of free and loosely bound water (see below), which occur during use of the lenses. Additionally, the presence of these three phases of dehydration may be the result of the existence of three classes of water. Initially, during the I phase, evaporate free water molecules, which are not involved in any interaction with polymer, hence the high average value of DR, while in II phase it is the loosely and maybe some portion of strongly bound water that dehydrates from the material. Finally, in the III phase, it is likely that some amount of the bound water evaporates. However, due to the water molecules interaction with polymer, this process seems to occur much more slowly than before (hence the low DR observed) and in laboratory conditions described above it leads to an equilibrium and not to complete removal of water from the lens.

Interestingly, studies comparing the dehydration of new and worn contact lenses [12] have shown that after a full-time wear (depending on the manufacturer recommendation: 30 or 15 days) DR rates for all the materials tested were increased. In our study DR rate is decreasing with the time of wearing and reaches its lowest value after 2 weeks of wearing (FIG. 2). This result may be due to the fact that with increasing time of use hydration of lenses studied decreases (FIG. 3), which was showed both in gravimetry and DSC measurements. Another factor influencing the change in the dynamics of dehydration may be reduction of the amount of free water in the polymer, which is probably due to deposition and denaturation of proteins [10,11]. As a result of water evaporation dry (hydrophobic) areas emerge that can contribute to the enhanced adsorption on the surface of contact lenses, also contributing to dehydration.



RYS. 3. Średnie EWC badanych soczewek dla poszczególnych czasów noszenia.
FIG. 3. Mean EWC values of lenses studied computed for certain times of wearing.

Różnice w wielkościach otrzymanych współczynników mogą też być wynikiem innego przygotowania próbek. W pracach González-Méijome i in. [12] przed pomiarem soczewki były równoważone przez min. 24 h w pozbawionym konserwantów roztworze soli fizjologicznej. Należy jednak podkreślić, że soczewki kontaktowe zakłada się na oko bezpośrednio po wyjęciu z opakowania handlowego, a podczas użytkowania są one czyszczone i przechowywane w specjalnych płynach wielofunkcyjnych, które poprzez zawartość różnych substancji mogą wpływać na proces dehydratacji, natomiast ze względów bezpieczeństwa roztwór soli fizjologicznej jest wręcz zakazany. Nie bez znaczenia jest też osmolarność, która w przypadku soli fizjologicznej i roztworów sztucznych łez może wynosić 150-350 mOsmol/l, podczas gdy fizjologiczna wartość dla łez może się wahać w zakresie 300-320 mOsmol/l [14, 15], a podczas noszenia (w wyniku odwadniania soczewki) ulega zwiększeniu.

Korzystając z zależności (2) obliczono uwodnienie badanych soczewek. Jak widać na RYS. 3, uwodnienie próbek używanych jest mniejsze w porównaniu do soczewek nowych, jednak od trzeciego dnia ulega jedynie niewielkim zmianom, a najmniejszą wartość osiąga po 14 dniach noszenia. Jak wspomniano powyżej, wynik ten jest prawdopodobnie spowodowany odkładaniem się w soczewce składników filmu łzowego.

DSC

Przykładowe krzywe kalorymetryczne otrzymane dla badanych soczewek przedstawia RYS. 4. W przypadku nowych soczewek na wykresie DSC widoczny jest jeden, nieco asymetryczny pik o maksimum w okolicy -1°C . Możliwe, że w tym przypadku pojawiający się przy temp. -6°C w pomiarach soczewek używanych drugi pik, złał się ze znacznie większym pikiem pierwszym. Zmniejszenie komponenty wody wolnej (a co za tym idzie – całkowitego uwodnienia) pozwala na łatwiejsze wydzielenie dwóch pików na wykresach DSC, będących odpowiednikami wody wolnej i luźno związanej. We wcześniejszych badaniach DSC wykonanych na hydrożelach z grupy I FDA [10, 11] nowych jak i nasączonych roztworem sztucznych łez, na endotermach topnienia widoczny był tylko jeden pik w okolicy 0°C , co wskazuje, iż nie obserwowano w nich wody luźno związanej. W badaniach Mirejovskiego i współ. [11] stwierdzono też brak zmian w strukturze wody po 1, 5 i 10 dniach ekspozycji materiału polymacon na lizozym. Jednak dla hydrożeli z pozostałych grup FDA, które absorbowały większe ilości białka z roztworu, zauważono istotne zmiany na krzywych DSC.

Na podstawie pomiarów DSC możliwe było wyznaczenie ilości wody wolnej i luźno związanej (C) w materiale, która została obliczona z poniższej zależności:

$$C = \frac{Q}{\Delta H} \quad (3)$$

gdzie ΔH – ciepło topnienia lodu (333,7 J/g) [16], Q – ciepło przemiany, znajdujące swoje odbicie na wykresie DSC w postaci pików. Ilość wody związanej (B) można wyznaczyć następująco:

$$B = \text{EWC} - C \quad (4)$$

Jak wynika z analizy grawimetrycznej (patrz powyżej), wraz ze wzrostem czasu noszenia całkowite uwodnienie materiału maleje, co zostało uwzględnione przy obliczaniu ilości wody wolnej i związanej. Otrzymane wyniki (RYS. 5) wskazują, iż skutek użytkowania dochodzi do zmniejszenia zawartości zarówno wody wolnej jak i związanej. Istotniejsza wydaje się jednak być zmiana dot. wody wolnej i luźno związanej z materiałem, gdzie już po trzech dniach noszenia obserwujemy spadek z ok. 11% do niecałych 7%, a w następnych dniach do ok. 5,5%, co stanowi prawie połowę wartości początkowej.

Differences in the DR values obtained may also result from different samples preparation. González-Méijome et al. [12] before every measurement conducted min. 24 h equilibration of the samples in preservative-free saline. It should be noted, however, that the contact lenses are placed on eyes right after taking out of the container and during use they are cleaned and stored in a special multipurpose lens solutions, which, by the content of certain substances can affect the process of dehydration, and saline (for safety reasons) is prohibited. Not without meaning is osmolality, which in the case of saline solution and artificial tears may be 150-350 mOsmol/l, while the physiological value of the tears may vary in 300-320 mOsmol/l [14, 15], and during the wear (due to dehydration of the lens) it increases.

Using the formula (2) water content of the lenses tested was calculated. As shown in FIG. 3, the hydration of the samples used is smaller compared to new lenses. From the third day of wearing it undergoes only minor changes, and the lowest value of EWC is reached after 14 days of wearing. As noted before, this result is likely due to deposition of the components of the tear film.

DSC

Examples of calorimetric curves obtained for the lenses studied are presented in FIG. 4. DSC curves of the new lenses show one slightly asymmetric peak with maximum at -1°C . It is possible that in this case the peak, which appears at about -6°C in worn lenses measurements as a second one, blends with much bigger first peak. Reduction of free water components (and hence - the total water content) allows for easier separation of the two peaks in the DSC plots, which are equivalent to free water and loosely bound. In previous DSC studies performed on hydrogels from I FDA group [10, 11], new and soaked with a solution of artificial tears, melting endotherms have shown only one peak around 0°C , indicating that there was no loosely bound water in material. In protein adsorption studies [10] also no change in the structure of the water after 1, 5 and 10 days of exposure to lysozyme in polymacon material was found. However, for hydrogels from other FDA groups, which absorb larger amounts of proteins from solution, significant changes in the DSC curves were noted.

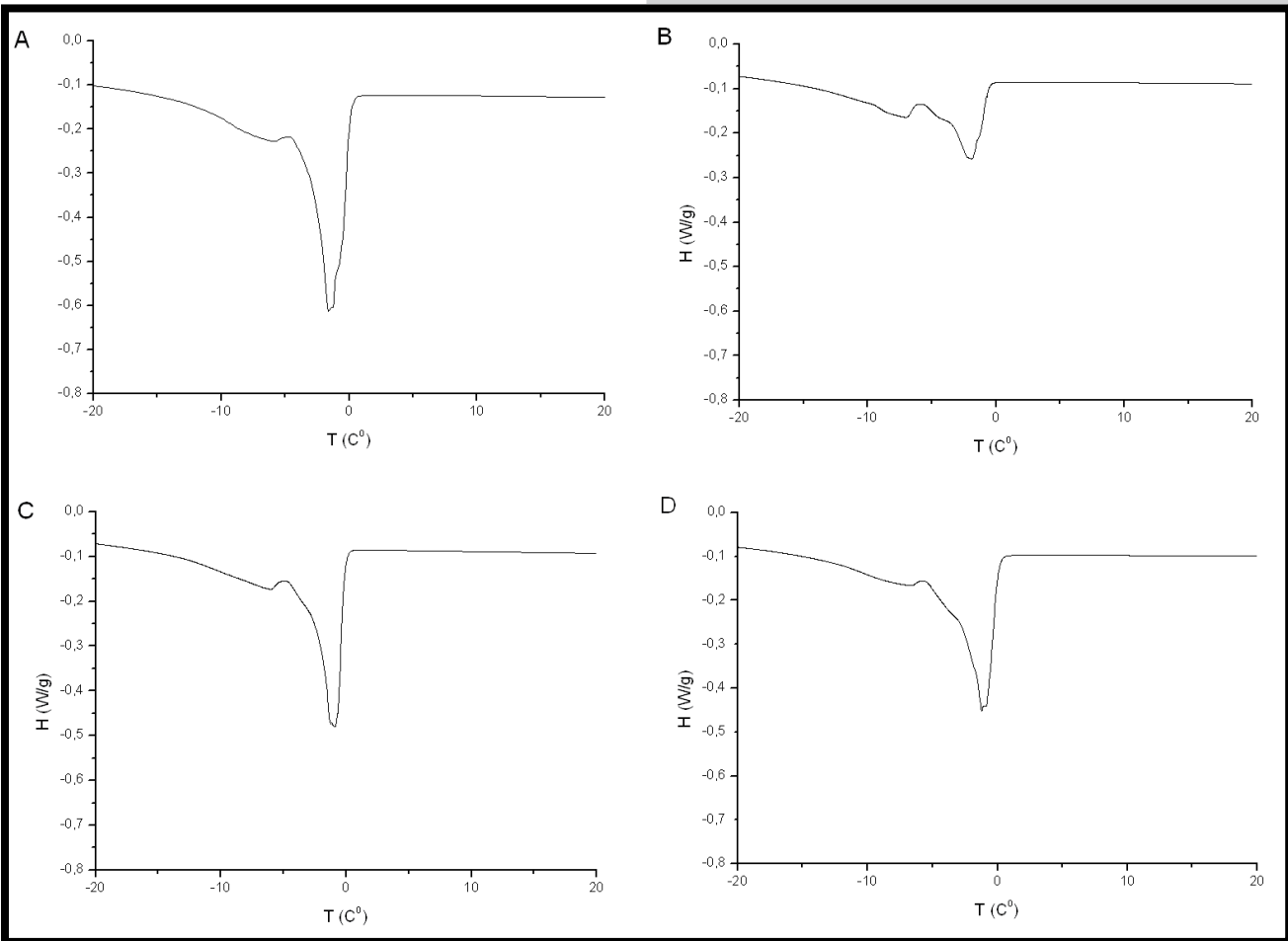
On the basis of DSC measurements it was possible to determine amount of free and loosely bound water (C) in the material, which was calculated from the following equation:

$$C = \frac{Q}{\Delta H} \quad (3)$$

where ΔH - heat of fusion of water (333.7 J/g) [16], Q – heat of transition, reflected in the DSC curves as peaks. The amount of bound water (B) can be determined as follows:

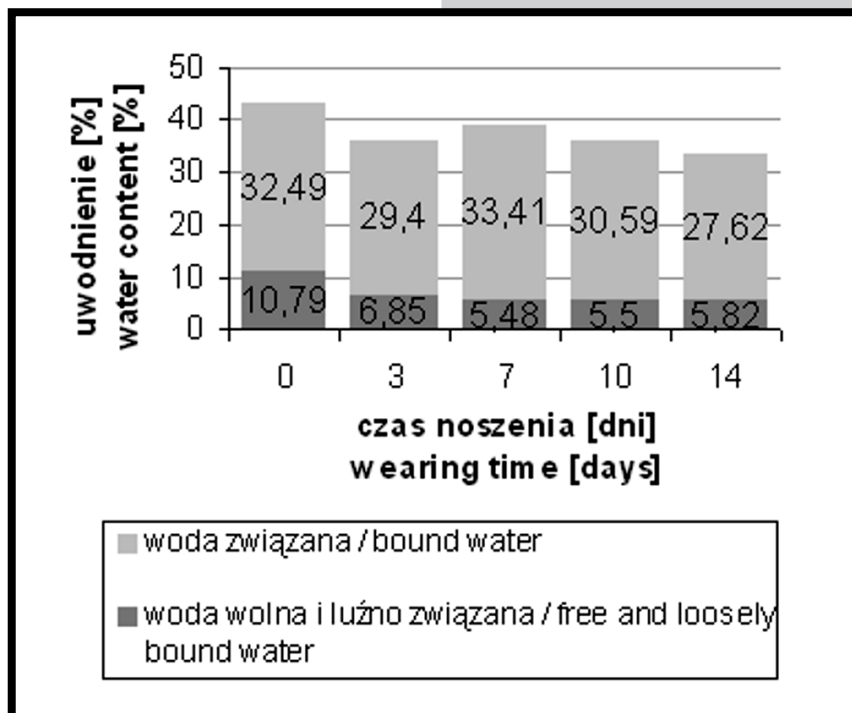
$$B = \text{EWC} - C \quad (4)$$

From the gravimetric analysis (see above), with increasing time of wearing water content of the material decreases, which was taken into account when calculating the amount of free and bound water. The values obtained (FIG. 5) show that as a result of use it comes to the reduction of both free and bound water. However, it seems that more important is a change in the amount of free and loosely bound water, where after three days of wearing a decrease from approximately 11% to less than 7% is observed, and in the next few days to about 5.5%, which represents almost half of the initial value.



RYS. 4. Przykładowe krzywe kalorymetryczne otrzymane dla badanych soczewek: A – nowa; B, C i D – odpowiednio po 3, 7 i 10 dniach noszenia.

FIG. 4. Examples of calorimetric curves obtained for the lenses examined: A - a new; B, C and D - after 3, 7 and 10 days of wearing respectively.



RYS. 5. Stosunek wody wolnej do związanej w badanych soczewkach.

FIG. 5. The calculated free to bound water ratio.

Dotychczasowe badania [10,11,16] wykazały, iż soczewki hydrożelowe, niezależnie od ich stopnia uwodnienia, charakteryzują się podobną ilością wody związanej, a wraz ze wzrostem uwodnienia dochodzi do zwiększenia ilości wody wolnej i luźno związanej. Wydaje się jednak, że w przypadku badanego przez nas materiału silikonowo-hydrożelowego obserwowany spadek EWC (patrz powyżej) wynika nie tylko ze zmniejszenia zawartości wody wolnej i luźno związanej. Pojawiające się jednocześnie zmniejszenie zawartości wody bezpośrednio związanej z materiałem może być spowodowane absorpcją składników filmu łzowego, zmieniających rozkład wody w materiale. Ponieważ badane soczewki wyprodukowane są z materiału silikonowo-hydrożelowego, mogą one silniej niż hydrożele zbierać składniki lipidowe. Ich obecność może wpływać na uwodnienie materiału w sposób dwojaki: hydrofobowa natura lipidów może odpychać polarne cząsteczki wody lub zwiększać absorpcję białek, których późniejsza denaturacja może doprowadzać do zwiększenia ich polarności i związania cząsteczek wody. Zgodnie z dotychczasową wiedzą na temat interakcji woda-polimer, pierwszy efekt wydaje się jednak mieć mniejsze znaczenie, ponieważ oddziaływania hydrofobowe cechują się niższą energią niż polarne [17].

Pojawienie się na skutek noszenia w materiale zmian strukturalnych mogących wpłynąć na uwodnienie wydaje się być mało prawdopodobne, ponieważ hydrożele w stanie uwodnionym ulegają całkowicie odwracalnym deformacjom (np. podczas tarcia mechanicznego wywołanego mruganiem) [18]. Możliwe jednak, iż po dłuższym użytkowaniu odsłonięciu uległy hydrofobowe łańcuchy siloksanowe, doprowadzając do zmniejszenia zawartości wody związanej. Problem ten wymaga dalszych badań.

Wnioski

Opisane powyżej badania jednoznacznie wskazują, iż użytkowanie soczewek kontaktowych powoduje zmiany uwodnienia materiału silikonowo-hydrożelowego, co potwierdzają pomiary wykonane metodą grawimetryczną oraz DSC. Podczas noszenia dochodzi również do zmiany rozkładu poszczególnych klas wody. Oba zjawiska wydają się być konsekwencją odkładania się w materiale i na jego powierzchni składników filmu łzowego. Ma to swoje kliniczne konsekwencje, ponieważ u pacjentów o zaburzonej stabilności filmu łzowego (ZSO, choroby ogólne, zażywane leki) absorpcja zanieczyszczeń może być zwiększona, a dyskomfort tym spowodowany może pojawić się już po kilku dniach noszenia. Jak wynika z powyższego, dalsze badania są konieczne w celu uzyskania lepszych, biokompatybilnych materiałów do produkcji soczewek kontaktowych.

Jak pokazują badania dehydratacji, wraz ze wzrostem czasu noszenia, dochodzi do zmiany dynamiki tego procesu, co wydaje się być wynikiem przyłączania się do materiału składników filmu łzowego. Zjawisko to znajduje swoje odzwierciedlenie w wartościach współczynnika DR oraz w zmianie czasu trwania poszczególnych faz dehydratacji. W odróżnieniu od wcześniejszych prac, otrzymane przez nas wyniki wskazują na zmniejszenie dehydratacji materiału senofilcon A po upływie zalecanego czasu użytkowania (14 dnia). Dodatkowo, przeprowadzone przez nas pomiary wskazują, iż współczynnik DR jest mniejszy od początkowego także po 3, 7 i 10 dniach noszenia. Obserwowane zwolnienie i zmniejszenie dehydratacji może wydawać się korzystne dla użytkowników soczewek kontaktowych, jednak należy pamiętać, iż obecność w materiale zanieczyszczeń białkowych może wywoływać odpowiedź immunologiczną prowadząc do powstawania stanów zapalnych w przednim odcinku oka.

Previous studies [10,11,16] showed that the hydrogel lenses, regardless of their degree of hydration, are characterized by a similar amount of bound water, and with increasing water content in these materials increase in the amount of free and loosely bound water occurs. However, in our study of silicone-hydrogel lenses it seems that the observed decrease in EWC (see above) not only reduces the content of free and loosely bound water. Appearing at the same time reduction in the tightly bound water content may be due to absorption of the tear film components that changes the distribution of water in the material. Since the lenses studied are made of silicone-hydrogel material, they can stronger than hydrogels collect the lipid components of the tear film. Their presence may affect the hydration of the material in two ways: the hydrophobic nature of lipids can repel polar molecules of water or increase the absorption of proteins which later may undergo denaturation, increasing their polarity and thus binding more water molecules. According to the current knowledge on the water-polymer interactions, the first effect, however, seems to be less important, because the hydrophobic interactions have lower energy than the polar [17].

The structural changes that may occur due to lens wearing, that could affect its hydration seems to be unlikely, because hydrated hydrogels undergo a completely reversible deformation (e.g. from mechanical friction caused by blinking) [18]. It is however probable, that after continuous use hydrophobic siloxane chains can be uncovered, leading to a reduction in the bound water content. This problem needs to be further investigated.

Conclusions

This research has clearly indicated that the use of contact lenses causes changes in water content of silicone hydrogel material, which is confirmed by both gravimetric and DSC measurements. During wearing also changes in the distribution of each class of water occur. Both effects appear to be a consequence of tear film components deposition on the surface and inside the polymer matrix. This has clinical implications because in case of patients with impaired tear film stability (DES, general diseases, medications) absorption of contaminants can be enhanced, and discomfort after several days of wearing may occur. To conclude, further studies are necessary in order to obtain better, more biocompatible materials for contact lenses.

Our studies of dehydration show that with increasing wearing time a change in the dynamics of this process appears, which seems to be the result of the tear film components deposition. This phenomenon is reflected in the changes of values of the dehydration rate DR and stages of dehydration duration times. In contrast to previous studies, our results indicate a reduction in dehydration of the material senofilcon A after the expiration of the recommended time of use (14 days). In addition, we have performed measurements which indicate that the DR rate is smaller than the initial after 3, 7 and 10 days of wear. The decrease of dehydration observed may seem to be beneficial for contact lens users. However, the presence of protein impurities in the material can induce an immune response leading to the inflammation in the anterior eye.

Zastosowanie metody DSC pozwoliło na ocenę rozkładu wody w badanych soczewkach. Ich użytkowanie doprowadza do istotnej zmiany ilości wody wolnej i luźno związanej z materiałem, co może znacząco wpływać na charakterystykę transportu przez badane soczewki. Ponieważ materiał senofilcon A należy do polimerów silikonowo-hydrożelowych, nie będzie tutaj dochodziło do obniżenia transmisji tlenu, jednak zmniejszenie dyfuzji jonów znajdujących się w filmie łzowym może doprowadzać do zmniejszenia ruchomości soczewki na oku i wraz z postępującym jej odwadnianiem spowodować zmniejszenie komfortu pacjenta.

Dodatkowo, wskutek odślonięcia hydrofobowych łańcuchów materiału silikonowo-hydrożelowego będącego wynikiem odparowywania filmu łzowego z przedniej powierzchni soczewki, adsorpcja białek i lipidów na może ulec nasileniu. To z kolei będzie prowadziło do obniżenia zwilżalności powierzchni i zwiększenia tarcia powiek, a w efekcie dyskomfort i ewentualne uszkodzenia spojówki powiekowej.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować firmie Johnson&Johnson Polska za zapewnienie soczewek kontaktowych na potrzeby naszych badań. Praca ta jest częściowo wspierana przez program operacyjny 'Kapitał Ludzki' - PO KL 4.1.1 „Proinnowacyjne kształcenie, kompetentna Kadra, absolwenci Przyszłości”.

The use of DSC allowed us the evaluation of water distribution in the tested lens. There is a significant decrease in the amount of free and loosely bound water among material that may significantly affect the transport characteristics of lenses. Since senofilcon A is silicone-hydrogel, there will be no drop in oxygen transmission. However, decrease in diffusion of contained in tear film ions may lead to reduction in lenses on-eye mobility along with its progressive dehydration that can negatively affect patients comfort.

In addition, as a result of uncovering the hydrophobic chains of silicone-hydrogel material that can appear with evaporation of the tear film from the lens surface, protein and lipid adsorption may increase. This in turn will lead to a reduction in surface wettability and enhance lids friction, resulting in discomfort and possible damage to the eyelid conjunctiva.

Acknowledgments

The authors would like to thank Johnson & Johnson Poland and for providing contact lenses to our research. This work was partially supported by Operational Program 'Human Capital' - PO KL 4.1.1, 'Proinnowacyjne kształcenie, kompetentna kadra, absolwenci przyszłości'.

Piśmiennictwo

- [1] Pedley D., Tighe B.: Water binding properties of hydrogel polymers for reverse osmosis and related applications, *British Polymer Journal* 11 (1979) 130-136.
- [2] Morgan P.B., Efron N., Morgan S.L., Little S.A.: Hydrogel contact lens dehydration in controlled environmental conditions. *Eye & Contact Lens* 30 (2004) 99-102.
- [3] Tranoudis I., Efron N.: Parameter stability of soft contact lenses made from different materials. *Contact Lens & Anterior Eye* 27 (2004) 115-31.
- [4] Goto E., Yagi Y., Matsumoto Y., Tsubota K.: Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *American Journal of Ophthalmology* 133 (2002) 181-186.
- [5] Ramamoorthy P., Sinnott L.T., Nichols J.J.: Contact lens material characteristics associated with hydrogel lens dehydration. *Ophthalmic & Physiological Optics* 30 (2010) 160-166.
- [6] Young G.: Why one million contact lens wearers dropped out. *Contact Lens & Anterior Eye* 27 (2004) 83-85.
- [7] Fonn D., Situ P., Simpson T.: Hydrogel lens dehydration and subjective comfort and dryness ratings in symptomatic and asymptomatic contact lens wearers. 76 (1999) 700-704.
- [8] Chalmers R., Long B., Dillehay S., Begley C.: Improving contact-lens related dryness symptoms with silicone hydrogel lenses. *Optometry and Vision Science* 85 (2008) 778-784.
- [9] Nichols P.C., Vogt J.: Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials* 22 (2001) 3273-3283.
- [10] Mirejovsky D., Patel A.S., Rodriguez D.D.: Effect of proteins on water and transport properties of various hydrogel contact lens materials, *Current Eye Research* 10 (1991) 187-195.

References

- [11] Mirejovsky D., Patel A.S., Rodriguez D.D., Hunt T.J.: Lipid adsorption onto hydrogel contact lens materials. Advantages of Nile red over oil red O in visualization of lipids, *Optometry & Vision Science*, 68 (1991) 858-864.
- [12] González-Méjome J.M., López-Alemán A., Almeida J.B., Parafita M.A.: Dynamic in vitro dehydration patterns of unworn and worn silicone hydrogel contact lenses. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 90 (2009) 250-258.
- [13] Sariri R., Ghafoori H.: Tear proteins in health, disease, and contact lens wear. *Biochemistry* 73 (2008) 381-392.
- [14] Ambroziak A.M., Langwińska-Wośko E., Koriwn M.: Osmolarity – current view on new standard in tear film disorders diagnostics. *Kontaktologia i Optyka Okulistyczna* 1/25 (2010) 42-48.
- [15] Lum E., Perera I., Ho A.: Osmolality and buffering agents in soft contact lens packaging solutions. *Contact Lens & Anterior Eye* 27 (2004) 21-26.
- [16] Efron N., Tranoudis I.: Water properties of soft contact lens materials. *Contact Lens & Anterior Eye* 27 (2004) 193-208.
- [17] McBrierty V.J., Martin S.J., Karasz F.E.: Understanding hydrated polymers: the perspective of NMR. *Journal of Molecular Liquids* 80 (1999) 179-205.
- [18] Anseth K.S., Bowman C.N., Brannon-Peppas L.: Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* 17 (1996) 1647-1657.

SYNTEZA ENZYMATYCZNA POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU) (PBS) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZEPU *CANDIDA ANTARCTICA*: NOWY, OBIECUJĄCY MATERIAŁ DLA ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

MIROSLAWA EL FRAY*, BOGUSŁAWA GRADZIK

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN

* E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono polimeryzację enzymatyczną biodegradowalnego poliestru – poli(bursztynianu butylenu) (PBS) przy użyciu lipazy B, pochodzącej ze szczepu *Candida antarctica*. Polimeryzację przeprowadzono metodą roztworową przy zastosowaniu eteru difenylowego jako medium reakcji. W celu zachowania homogeniczności mieszaniny reakcyjnej użyto estru kwasu bursztynowego, bursztynianu dietylu oraz 1,4-butanediolu. Polimeryzację prowadzono w ustalonej temperaturze 80°C, zmieniając ciśnienie podczas etapu polikondensacji, odpowiednio 0,3; 1 i 2 mmHg. Oceniono wpływ tego parametru na budowę chemiczną i właściwości fizyko-chemiczne otrzymanego poliestru. Stwierdzono, że niskie ciśnienie zastosowane na etapie polikondensacji powoduje wzrost masy molowej (M_n), zmniejszenie ilości wolnych grup hydroksylowych oraz wzrost temperatury topnienia finalnego poliestru. Optymalne warunki prowadzenia reakcji zanotowano przy ciśnieniu rzędu 0,3 mmHg, przy którym osiągnięto wysoką wydajność reakcji (37%) i najwyższą wartość masy molowej (ponad 2,5 kDa) zaledwie po 9 h prowadzenia reakcji.

Słowa kluczowe: polimeryzacja enzymatyczna, poli(bursztynian butylenu), lipaza, polikondensacja

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 26-31]

Wprowadzenie

Polimery biodegradowalne są najczęściej stosowanymi materiałami w aplikacjach medycznych, szczególnie w inżynierii tkankowej. Należą do nich poliestry alifatyczne, takie jak poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) i ich kopolimery [1]. Zazwyczaj są one syntezowane na drodze procesu chemicznego gdzie substraty – monomery ulegają polimeryzacji w obecności różnych układów katalitycznych, głównie alkoholatów lub tlenków metali [2-5]. Niestety, wiele spośród wymienionych układów wykazuje właściwości toksyczne [6,7], dlatego enzymy wzbudzają coraz większe zainteresowanie w ostatnich latach jako nietoksyczne i wysoce selektywne układy katalityczne. Enzymy należą do grupy biokatalizatorów odpowiedzialnych za przemiany metaboliczne *in vivo*, włączając syntezę biopolimerów (biomakromolekuł). W ostatnich latach enzymy zaczęto stosować jako katalizatory w syntezie wielofunkcyjnych polimerów o dobrze zdefiniowanej strukturze.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(BUTYLENE SUCCINATE) (PBS) CATALYZED BY LIPASE B FROM *CANDIDA ANTARCTICA*: A NEW PROMISING MATERIAL FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

MIROSLAWA EL FRAY*, BOGUSŁAWA GRADZIK

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, SZCZECIN, BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND

* E-MAIL: MIRFRAY@ZUT.EDU.PL

Abstract

In this work, the enzymatic polymerization of biodegradable polyester - poly(butylene succinate) (PBS) with the use of lipase B, derived from *Candida antarctica* strain is presented. The polymerization was performed by the solution method with the use of diphenyl ether as a solvent. To avoid the phase separation of monomers diethyl succinate and 1,4-butanediol were applied. The polymerization was carried out at a fixed temperature of 80°C, at variable pressure during polycondensation, namely 0.3, 1, and 2 mmHg. The influence of this parameter on the chemical structure and physico-chemical properties of resulting polyesters were examined. It was observed that low pressure used in the polycondensation facilitated an increase of the molecular weight (M_n), the reduction in -OH groups number and an increase in the melting point of the resulting polyesters. The most effective pressure conditions were found at 0.3 mmHg where relatively high yield of the reaction (37%) and the highest molecular weight (above 2.5 kDa) were found after only 9 hours of the reaction.

Keywords: enzymatic polymerization, poly(butylene succinate), lipase, polycondensation

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 26-31]

Introduction

Biodegradable polymers are among the most commonly used materials in medical field, especially in tissue engineering. These include aliphatic polyesters, such as poly(lactic acid)(PLA), poly(glycolic acid)(PGA), poly(ϵ -caprolactone)(PCL), and their copolymers [1]. They are usually synthesized by chemical processes where monomeric units are polymerized in a presence of different catalytic systems, mostly alkoxides or oxides [2-5]. Unfortunately, many of these catalysts are reported to be toxic [6,7], therefore enzymes have attracted intensive interest in the past decades as non toxic and highly selective catalytic systems. Enzymes are biocatalysts, which catalyse all metabolic reactions *in vivo*, including biopolymers (biomacromolecules) synthesis. In the past decades, enzymes have emerged as potent catalysts for the preparation of well-defined functional polymers. For the synthesis of biodegradable polyesters, some isolated lipases were used since they are stable in organic solvents and can act as catalyst for reverse reactions, esterifications, and transesterifications in organic media.

Do syntezy biodegradowalnych poliestrów stosowane są najczęściej lipazy ze względu na ich stabilność w mediach organicznych, a także dlatego, że są zdolne do katalizowania reakcji odwrotnych – estyfikacji oraz transestryfikacji w tychże mediach.

Poli(bursztynian butylenu) (PBS) jest typowym, powstającym z diolu i dikwasu biodegradowalnym, alifatycznym poliestrem o dobrych właściwościach mechanicznych. PBS wykazuje biokompatybilność w kontakcie z komórkami osteoblastów indukując ich namnażanie oraz różnicowanie [8]. Degradacja hydrolytyczna wykazała, że PBS ulegając degradacji w roztworze soli buforowanej wykazuje zachowanie podobne do poli(α -hydroksykwasów). Testy mechaniczne wykazały, że PBS był bardziej plastyczny od PLLA i ta plastyczność wraz z niską temperaturą topnienia oraz stabilnością termiczną odpowiada za znakomite właściwości przetwórcze PBS. Produkty jego degradacji są nietoksyczne (cząsteczki bursztynianu wchodzi w cykl Krebsa), dlatego materiał ten jest obiecującym kandydatem do zastosowań medycznych [8-11], szczególnie do rekonstrukcji tkanek miękkich i inżynierii tkankowej. Jak dotąd, aktywność katalityczna lipaz została wykorzystana do syntezy wysokocząsteczkowego PBS [12-17], jednakże bezpośrednia synteza kwasu bursztynowego z 1,4-butanodiolem jest trudna z powodu rozdzielenia fazowego reagentów. W celu uniknięcia tego problemu używa się estrów kwasu bursztynowego, bursztynianu dietylu i 1,4-butanodiolu uzyskując homogeniczną mieszaninę reakcyjną [18,19]. Polimeryzacja katalizowana lipazami wykazuje wysoką chemo-, regio- i enancjo-selektywność, co pozwala utrzymać dobrą kontrolę nad budową chemiczną i finalnymi właściwościami PBS.

W pracy przedstawiono polimeryzację enzymatyczną poli(bursztynianu butylenu) katalizowaną lipazą B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica* i prowadzoną w roztworze pod różnym ciśnieniem. Przeanalizowano budowę chemiczną oraz właściwości termiczne.

Materiały i metody

Materiały

Poli(bursztynian butylenu) (PBS) otrzymano metodą polimeryzacji enzymatycznej przy użyciu estru kwasu bursztynowego, bursztynianu dietylu i 1,4-butanodiolu (1,4-BD), w organicznym rozpuszczalniku (eter difenylowy). Jako katalizatora użyto lipazę B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica* o nazwie handlowej Novozym 435th (N435). Przybliżony schemat syntezy przedstawiono na RYS. 1.

Enzym N435 (10% wag./wsad) wysuszone pod ciśnieniem 0,1 mmHg w temperaturze 25°C przez 24 h, a następnie przeniesiono do kolby kulistej o pojemności 50 ml zawierającej monomery: bursztynian dietylu i 1,4-butanodiol zawieszony w rozpuszczalniku organicznym – eter difenylowy (200% wag./wsad). Mieszanina reakcyjna była ogrzewana w temperaturze 80°C przy użyciu mieszadła magnetycznego. Reakcję prowadzono pod ciśnieniem atmosferycznym przez pierwsze 2 h w celu przekształcenia monomerów do oligomerów. Następnie, ciśnienie zredukowano do 0,3; 1 lub 2 mmHg, bez zmiany temperatury i reakcję prowadzono dalej przez 9 h. Do kontroli ciśnienia w układzie użyto zawór dozujący.

Uzyskaną mieszaninę reakcyjną rozpuszczono w chloroformie i przefiltrowano w celu usunięcia katalizatora. Roztwór polimeru w chloroformie dodano powoli przy ciągłym mieszaniu do metanolu w celu strącenia białego, krystalicznego produktu. Strącony polimer przemyto metanolem pięć razy i wysuszone w 50°C przez 16 h.

Syntezę prowadzono pod różnym ciśnieniem, tj. 0,3; 1 i 2 mmHg, a otrzymane materiały oznaczono odpowiednio jako: PBS-1, PBS-2 i PBS-3.

Poly(butylene succinate) (PBS) is a typical diol-diacid type biodegradable aliphatic polyester with excellent mechanical properties. PBS showed good biocompatibility in contact with osteoblasts inducing their proliferation and differentiation [8]. The hydrolytic degradation indicated that PBS was degrading in the saline buffer solution and showed similar behavior to poly(α -hydroxy acids). Mechanical tests revealed that PBS was far more ductile than PLLA and this ductility, together with the low melting point and thermal stability, suggested that PBS has excellent processability. Importantly, the degradation products are non-toxic (succinate molecules are included in the Crebs cycle), therefore this material is a great promise for biomedical applications [8-11], especially for soft tissue repair and tissue engineering. So far, lipase catalysis was successfully employed to synthesize the high molecular weight PBS [12-17], however a direct synthesis of succinic acid and 1,4-butanediol is difficult due to phase separation of the reagents. To overcome this problem, monophasic reaction mixtures were prepared from diethyl succinate and 1,4-butanediol [18,19]. The lipase-catalyzed polymerizations show very high chemo-, regio-, and enantio-selectivities what allows to keep a good control over the chemical structure and final properties of PBS.

In this work we will discuss the enzymatic polymerization of poly(butylene succinate) catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* conducted under variable pressure in the solution. The chemical structure and thermal properties will be discussed.

Materials and methods

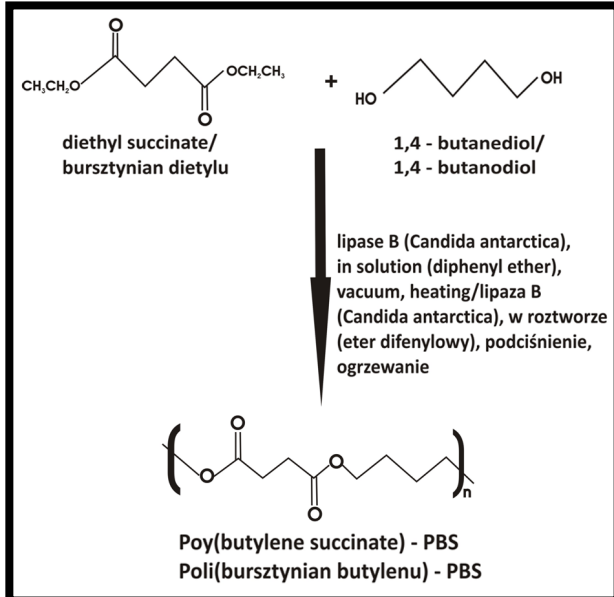
Materials

Poly(butylene succinate) (PBS) was prepared by enzymatic polymerization of succinic acid ester (diethyl succinate) and 1,4-butanediol (1,4-BD), in organic solvent (diphenyl ether). Lipase B derived from *Candida antarctica* strain, trade name Novozym 435th (N435), was used as a catalyst. The schematic outline of the synthesis is presented in FIG. 1.

N435 (10 wt% vs total monomer), dried under 0.1 mmHg vacuum at 25°C for 24 h, was transferred into a 50 ml round-bottom flask containing diethyl succinate and 1,4-butanediol with organic solvent - diphenyl ether (200 wt% vs total monomer). The reaction mixture was magnetically stirred and heated at a temperature 80°C. The reaction was carried out under atmospheric pressure for the first 2 h to convert the monomers to oligomers. The reaction pressure was then reduced to 0.3, 1 or 2 mmHg, respectively, with no change in the temperature and then the reaction was carried out for 9 hours. Manual valve was used to control the pressure in the system.

The resulting product mixture was dissolved in chloroform and then filtered to remove the catalyst. The resulting chloroform solution was slowly added with stirring to methanol to precipitate a white crystalline polymeric product. The precipitated polymer was washed with methanol five times and then dried in vacuum at 50°C for 16 h.

Synthesis was carried out at different pressure conditions: 0.3, 1 and 2 mmHg, respectively, and the synthesized materials were abbreviated accordingly as: PBS-1, PBS-2 and PBS-3.



RYS. 1. Schemat syntezy poli(bursztynianu butylenu) (PBS).

FIG. 1. Synthesis of poly(butylene succinate) (PBS).

Metody

Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) wykonano przy użyciu spektrometru Bruker DPX 400 w deuterowanym chloroformie. Widma zostały wykonane przy częstotliwości 400,13 MHz (^1H NMR). Tetrametylosilan użyto jako wzorzec wewnętrzny. Spektroskopię w podzderwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR) przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Thermo Nicolet ze złotą przystawką w zakresie liczb falowych 4000 do 400 cm^{-1} . Analizę termiczną metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) wykonano przy użyciu aparatu Q100 TA Instruments w potrójnym cyklu: grzanie-chłodzenie-grzanie w zakresie temperatur -100–250°C, przy szybkości grzania/chłodzenia 10 deg/min.

Wyniki i dyskusja

W wyniku syntezy enzymatycznej bursztynianu dietylu i 1,4-butanediolu, przeprowadzonej w czasie 9 h w łagodnych warunkach temperaturowych i przy zastosowaniu różnych ciśnień na etapie polikondensacji tj. 0,3; 1 i 2 mmHg, otrzymano poli(bursztynian butylenu) o budowie chemicznej pokazanej na spektrogramie ^1H NMR (RYS. 2).

Szczegółowe przesunięcia chemiczne dla materiałów otrzymanych pod zadanymi ciśnieniami wynoszą odpowiednio: **PBS-1:** A δ (2,55 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,08 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,60 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, sygnały o małej intensywności z powodu obecności końcowych grup zanotowano przy: D δ (3,60 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,19 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$; **PBS-2:** A δ (2,55 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,08 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,60 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, D δ (3,60 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,19 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$; **PBS-3:** A δ (2,63 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,14 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,66 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, D δ (3,65 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,24 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$.

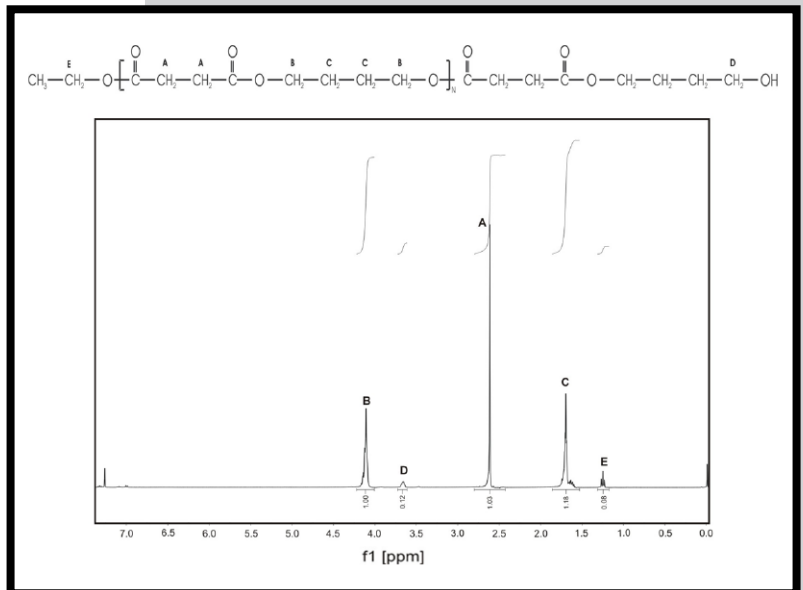
Methods

The nuclear magnetic resonance (NMR) was performed with a Bruker DPX 400 apparatus in deuterated chloroform. Spectra were obtained at frequencies of 400.13 MHz (^1H NMR). Internal standard was tetramethylsilane. The Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was carried out with Thermo Nicolet apparatus with the Golden Gate adapter in the range between 4000 and 400 cm^{-1} . The differential scanning calorimetry (DSC) was performed with the Q100 TA Instruments apparatus in a triple cycle: heating-cooling-heating in the range from -100–250°C at heating/cooling rate of 10 deg/min.

Results and Discussions

Enzymatic synthesis of diethyl succinate and 1,4-butanediol carried out for 9 hours in mild temperature conditions and variable polycondensation pressure, namely 0.3, 1 and 2 mmHg resulted in poly(butylene succinate) of chemical structure as depicted in the formula and shown in ^1H NMR spectrogram (FIG. 2).

A detailed shifts assignments for materials synthesized under all pressure conditions are as follows: **PBS-1:** A δ (2,55 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,08 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,60 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, low intensity signals due to end groups were observed at D δ (3,60 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,19 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$; **PBS-2:** A δ (2,55 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,08 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,60 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, D δ (3,60 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,19 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$; **PBS-3:** A δ (2,63 ppm) = 4H, $-\text{COCH}_2-$, B δ (4,14 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2\text{O}-$, C δ (1,66 ppm) = 4H, $-\text{CH}_2-$, D δ (3,65 ppm) = $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$, E δ (1,24 ppm) = $-\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}-$.



RYS. 2. Widmo ^1H NMR uzyskane dla PBS-3 otrzymanego pod ciśnieniem 2 mmHg.

FIG. 2. ^1H NMR spectrum of PBS-3 synthesized under 2 mmHg pressure.

TABELA 1. Masy molowe (M_n) oraz wydajności reakcji dla PBS otrzymanego pod różnymi ciśnieniami.
TABLE 1. The molecular weight (M_n) of PBS synthesised under different pressure.

Materiał Material	Zmienne ciśnienie Variable pressure	Oszacowane masy molowe na podstawie widm $^1\text{H NMR}$ Calculated molecular weight from $^1\text{H NMR}$	Wydajność Yield
	p [mmHg]	M_n [g/mol]	W [%]
PBS-1	0.3	2550	37
PBS-2	1.0	840	4
PBS-3	2.0	1150	41

Powyższa metoda pozwala także na oszacowanie masy molowej (M_n) uzyskanych polimerów. TABELA 1 zawiera oszacowane wartości M_n oraz wydajności reakcji.

Analiza struktury poliestru za pomocą techniki $^1\text{H NMR}$ wykazała liniową budowę uzyskanego materiału bez obecności struktur cyklicznych. Dla materiału PBS-1 osiągnięto najwyższą masę molową (M_n) oraz wysoką wartość wydajności reakcji ($W = 37\%$), co świadczy o osiągnięciu „stanu równowagi” reakcji przy niskiej wartości ciśnienia. Przy ciśnieniu 1 mmHg, wystąpił nagły spadek M_n , co wiąże się z najniższą konwersją reakcji (tylko 4%) dla tego materiału, natomiast przy $p = 2$ mmHg wartość masy molowej ponownie wzrosła (1150 g/mol) wraz z wydajnością reakcji wynoszącą 41%. Zgodnie z literaturą, przez pierwsze 10 h prowadzenia reakcji następuje skokowy wzrost M_n do wartości 5500 Da. Po tym czasie M_n wzrasta stopniowo od 8 000 do 10 000 Da w ciągu 24 do 72 h [20]. Bazując na tej wiedzy oraz na uzyskanych widmach $^1\text{H NMR}$, z których oszacowano wartości mas molowych dla otrzymanych materiałów, wykazano, że czas reakcji nie jest głównym parametrem wpływającym na polimeryzację enzymatyczną. Uzyskanie materiałów (PBS-2, PBS-3) o niskich wartościach M_n w reakcji polikondensacji może być skutkiem zachodzących reakcji odwracalnych takich jak gwałtowna transestryfikacja katalizowana lipazą [21]. Wykazano także, że reakcje, w których uczestniczą monomery zawierające dłuższe łańcuchy alkilenowe, zarówno kwasy (sebacynowy i adypinowy kwas) i diole (1,8-oktanodiol i 1,6-heksanodiol) wykazują wyższą reaktywność od reakcji, w których biorą udział krótkołańcuchowe monomery (np. kwas bursztynowy i glutarowy) i 1,4-butanodiol [13].

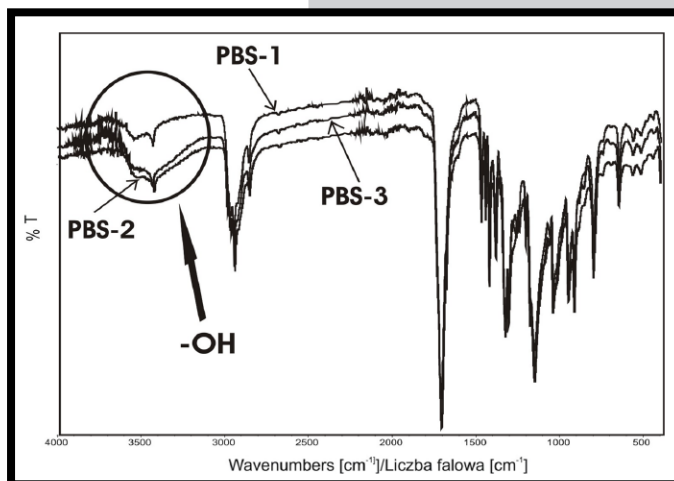
Potwierdzono także obecność specyficznych wiązań i grup dla uzyskanych materiałów przy użyciu spektroskopii w podczerwieni (RYS. 3).

Analiza widm IR potwierdziła utworzenie wiązań estrowych (1720 cm^{-1}) oraz obecność intensywnego, szerokiego pików od końcowych grup hydroksylowych przy długości fali $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$. Intensywność tego pików jest najniższa dla PBS-1, dla którego uzyskano najwyższą wartość masy molowej (wysoka wydajność) oszacowaną na podstawie widma $^1\text{H NMR}$.

This method also allowed to characterize the molecular weight of resulting polymers. TABLE 1 summarized the calculated values and the reaction yield.

By analyzing the polyester structure with $^1\text{H NMR}$ we found a linear structure without rings formation. PBS-1 material is characterized by the highest molecular weight (M_n) thus indicating that the “equilibrium” was achieved at the lowest pressure and high conversion (37% yield) was noticed. At 1.0 mm Hg, a sudden drop of M_n was observed, what corresponds to the lowest yield (only 4%), and then it increased again at 2.0 mm Hg and the conversion was about 41%. According the literature, the first 10 h of the reaction are necessary for rapid increase in M_n up to 5500 Da. Thereafter, M_n increased slowly to 8 000 and 10 000 by 24 and 72 h, respectively [20]. Thus, based on $^1\text{H NMR}$ spectra, the molecular weight of synthesised PBS indicate that the reaction time is not the only one prevailing parameter of the enzymatic reaction. The formation of a relatively low molecular weight polymers (PBS-2, PBS-3) by direct polycondensation can be a result of the reverse reaction as well as of the extensive transesterification reactions catalyzed by lipase [21]. It was also found that reactions involving monomers having longer alkylene chain lengths of diacids (sebacic and adipic acid) and diols (1,8-octanediol and 1,6-hexanediol) give a higher reactivity than reactions of shorter chain-length diacids (succinic and glutaric acid) and 1,4-butanediol [13].

The presence of specific bonds and groups of resulting PBS was also verified with the infrared spectroscopy (FIG. 3).



RYS. 3. Widma IR dla uzyskanych materiałów PBS pod różnymi ciśnieniami.

FIG. 3. IR spectra of enzymatically synthesized PBS at various pressure conditions.

The analysis of the IR spectra confirms the ester bonds formation (1720 cm^{-1}) and the appearance of distinct, broad peak at the wavelength $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, which correspond to the hydroxyl groups. The intensity of this peak is the lowest for the PBS-1 for which the highest molecular weight (and highest yield) was achieved as determined from NMR spectra.

TABELA 2. Charakterystyka termiczna dla uzyskanych materiałów PBS.
TABLE 2. Characteristic thermal behavior for synthesized PBS materials for synthesized PBS materials.

Numer próbki Sample code	T_m [°C]	ΔH_m [J/g]	T_c [°C]	ΔH_c [J/g]
PBS-1	110.3	102.6	72.6	70.76
PBS-2	90.4	78.06	54.4	83.81
PBS-3	99.5	148.7	63.9	104.30

gdzie: T_m - temperatura topnienia (drugi cykl ogrzewania), ΔH_m - entalpia topnienia, T_c - temperatura krystalizacji, ΔH_c - entalpia krystalizacji
 where: T_m - melting temperature (2nd heating run), ΔH_m - melting enthalpy, T_c - crystallization temperature, ΔH_c - crystallization enthalpy

Charakterystykę termiczną materiałów oznaczono na podstawie termogramów DSC i najwyższe piki odpowiadające temperaturze topnienia T_m , temperaturze krystalizacji T_c oraz odpowiadające im entalpie zestawiono w TABELI 2.

Materiał PBS-1 wykazuje znacznie wyższą wartość temperatury topnienia w porównaniu do materiału PBS-2, dla którego uzyskano także niższą wartość masy molowej oszacowanej z widma ¹H NMR oraz niższą wartość wydajności reakcji obliczoną ze stechiometrii. Podobną tendencję zaobserwowano w odniesieniu do temperatur krystalizacji. Biorąc pod uwagę fakt, że wartości temperatury topnienia, T_m oraz krystalizacji, T_c dla PBS otrzymanego na drodze konwencjonalnej (tj. przy użyciu katalizatorów organometalicznych), które wynoszą $T_m = 114-115^\circ\text{C}$ i $T_c = 75-76^\circ\text{C}$ [22], jest oczywistym, że materiał PBS-1 otrzymany w wyniku polimeryzacji enzymatycznej metodą roztworową wykazuje właściwości termiczne najbardziej zbliżone do komercyjnie dostępnego PBS.

Wnioski

Otrzymano poli(bursztynian butylenu) na drodze polimeryzacji enzymatycznej przy zastosowaniu różnych ciśnień. Wykazano, że poprzez modyfikację ciśnienia na etapie polikondensacji, wydajność reakcji związana z kinetyką polikondensacji uległa zmianie w wyniku czego uzyskano najwyższą wartość masy molowej przy zastosowaniu najniższego ciśnienia (PBS-1). Zostało to potwierdzone poprzez oszacowanie mas molowych na podstawie widm ¹H NMR. Spektroskopia w podczerwieni dla PBS-1 wykazała najmniejszą intensywność piku pochodzącego od grup -OH wskazując na dobrą konwersję monomerów. Właściwości termiczne dla materiału PBS-1 wskazały na najwyższą temperaturę topnienia i krystalizacji, czemu można przypisać także wysoką wartość masy molowej, a także wysoką wydajność osiągniętą w obecności lipazy B pochodzącej ze szczepu *Candida antarctica* podczas trwania 9-godzinnej reakcji. Jednakże stosunkowo niska wydajność (ok. 40%) i niska masa molowa wskazują na konieczność wydłużenia czasu reakcji oraz lepszej kontroli zmiennego ciśnienia na etapie polikondensacji.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego służącego rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich 517-10-012-4052/17.

The characteristic thermal behavior was determined from DSC scans, and high temperature melting peak, T_m and the crystallization temperature, T_c , and the corresponding enthalpies are summarized in TABLE 2.

It can be noticed that PBS-1 showed the melting peak at much higher temperature as compared to PBS-2 for which the lowest molecular weight was determined from ¹H NMR and the lowest yield was calculated from the stoichiometry. Similar dependence is observed for crystallization temperature. Taking into account that melting and crystallization temperatures for PBS synthesized in a conventional way (e.i. with the use of organometallic catalyst) are 114-115°C for melting point and 75-76°C for the crystallization temperature [22], it is evident that material PBS-1 obtained by enzymatic polymerization in solution at lowest pressure shows the most similar values of the thermal transitions to the commercially available PBS.

Conclusions

In this work, poly(butylene succinate) was synthesized during the enzymatic polymerization under varying pressures. It was showed that by changing pressure at the polycondensation stage, the conversion of the reaction, which corresponds to the kinetics of polycondensation, was altered and the highest molecular weight was obtained by applying the lowest pressure (PBS-1). This was confirmed by the molecular weight values calculated from ¹H NMR spectroscopy. The infrared spectroscopy revealed the smallest -OH band formation thus indicating good conversion of the monomers. The thermal properties of PBS-1 material are reflecting the highest melting and crystallization temperatures which again can be ascribed to the highest molecular weight and high conversion achieved under the presence of lipase B from *Candida antarctica* during only 9 hours of the reaction. However, relatively low yield (app. 40%), and low molecular weight indicates that reaction time should be extended and applied pressure needs to be controlled over the entire synthesis of the PBS material.

Acknowledgments

This work was supported by the research project "Young scientists and graduate students 517-10-012-4052/17".

Piśmiennictwo

- [1] Taylor M.S., Daniels A.U., Andriano K.P., Heller J.: Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials* 5(2) (1994) 151-157.
- [2] Oviatt T.M., Coates G.W.: Stereochemistry of Lactide Polymerization with Chiral Catalysts: New Opportunities for Stereocontrol Using Polymer Exchange Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* 124(7) (2002) 1316-1326.
- [3] Davis R.J., Liu Z.: Titania-silica: a model binary oxide catalyst system, *Chem. Mater.* 9(11) (1997) 2311-2324.
- [4] Kim Y., Verkade J.G.: Living Polymerization of Lactide Using Titanium Alkoxide Catalysts, *Macromolecular Symposia Special Issue: Bio-Based Polymers: Recent Progress* 224(1) (2005) 105-118.
- [5] Jacquel N., Freyermouth F., Fenouillot F., Rousseau A., Pascault J.P., Fuertes P., Saint-Loup R.: Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49(24) (2011) 5301-5312.
- [6] Stohs S.J., Bagchi D.: Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* 18(2) (1995) 321-336.
- [7] Anderson J.M.: Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 31 (2001) 81-110.
- [8] Li H., Chang J., Cao A., Wang J.: In vitro Evaluation of Biodegradable Poly(butylene succinate) as a Novel Biomaterial. *Macromolecular Bioscience* 5(5) (2005) 433-440.
- [9] Wang H., Ji J., Zhang W., Zhang Y., Jiang J., Wu Z., Pu S.: Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly(butylenes succinate). *Acta Biomaterialia* 5(1) (2009) 279-287.
- [10] Xu J., Guo B-H.: Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate) and Applications. *Microbiology Monographs* 2010, vol.14.
- [11] Xu J., Guo H-B.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1149-1163.
- [12] Kobayashi S., Makino A.: Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry. *Chem. Rev.* 109 (2009) 5288-5353.

References

- [13] Mahapatro A., Kalra B., Kumar A., Gross R.A.: Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure. *Biomacromolecules* 4 (2003) 544-551.
- [14] Akkara J.A., Ayyagari M.S.R., Bruno F.F.: Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents. *TIBTECH FEBRUARY* 1999 (vol 17).
- [15] Uyama H., Kobayashi S.: Enzymatic Synthesis of Polyesters via Polycondensation. *Advances in Polymer Science* 194 (2006) 133-158.
- [16] Puskas J.E., Sen M.Y., Seo K.S.: Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, Enzymes. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 2959-2976.
- [17] Kobayashi S.: Lipase-catalyzed polyester synthesis - A green polymer chemistry. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* (2010) 86.
- [18] Linko Y-Y, Wang Z., Seppälä J.: Lipase-Catalyzed Synthesis of Poly(1,4-Butanediol Succinate) in Organic Solvent. *Biocatalysis* 8(4) (1994) 269-282.
- [19] Binns F., Harffey P., Roberts S.M., Taylor A.: Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 36(12) (1998) 2069-2079.
- [20] Azim H., Dekhterman A., Jiang Z., Gross R.A.: Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Synthesis of Poly(butylene succinate): Shorter Chain Building Blocks Also Work. *Biomacromolecules* 7 (2006) 3093-3097.
- [21] Sugihara S., Toshima K., Matsumura S.: New Strategy for Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) via Cyclic Oligomers. *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 203-207.
- [22] Xu J., Guo B.H.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal* 5(11) (2010) 1149-1163.

ODPORNOŚĆ KOROZYJNA STOPU BIOMEDYCZNEGO M30NW W OBECNOŚCI ALBUMINY I γ -GLOBULINY

BARBARA BURNAT*, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART

UNIwersytet Łódzki, Wydział Chemii,
Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

* E-MAIL: BURNAT@CHEMIA.UNI.LODZ.PL

Streszczenie

Zbadano wpływ albuminy i γ -globuliny osocza wołowego na odporność korozyjną stopu biomedycznego M30NW. Pomiar korozyjny z wykorzystaniem metod elektrochemicznych przeprowadzono w odtlenionym buforowanym roztworze 0,9% NaCl o pH równym 7,4. Badania te przeprowadzone zostały w dniu 0 (badania przyspieszone korozyjny) i w ciągu 84 dni (badania korozyjny długoczasowej). W badaniach przyspieszonych korozyjny wyznaczono szereg wielkości charakteryzujących właściwości korozyjne badanego stopu M30NW: potencjał korozyjny E_{cor} , opór polaryzacyjny R_p , szybkość korozyjny CR, gęstość prądu w obszarze pasywnym $i_{0,4}$ oraz potencjały przebiccia E_b i repasywacji E_{rep} . Stwierdzono, że dodatek albuminy i γ -globuliny do buforowanego roztworu 0,9% NaCl powoduje niewielkie pogorszenie odporności korozyjny stopu M30NW w dniu 0. Pogorszenie tej odporności praktycznie nie zależy od rodzaju i stężenia białek. W badaniach korozyjny długoczasowej wykonywano pomiary potencjału korozyjny i charakterystyk Stern-Geary'ego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że odporność korozyjny stopu M30NW wzrasta we wszystkich roztworach, z tym że w obecności albuminy wzrost ten jest słabszy niż w obecności γ -globuliny.

Słowa kluczowe: biomateriały, białka, korozyjny, metody elektrochemiczne

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 32-37]

Wprowadzenie

Wstępna ocena właściwości korozyjnych biomateriałów metalicznych przeprowadzana jest w warunkach laboratoryjny najczęściej z zastosowaniem klasycznych metod elektrochemicznych w oparciu o opracowane normy krajowe i międzynarodowe. W ocenie tej stosowane są przede wszystkim roztwory NaCl oraz roztwory będące sztucznymi roztworami fizjologicznymi (np. roztwór Ringer'a, Tyrode'a, Hank'a, itp.). Roztwory te uwzględniają głównie składniki nieorganiczne wchodzące w skład komórek, tkanek i płynów ustrojowy: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HCO_3^{2-} . Rzeczywiste płyny ustrojowe człowieka bogate są również w różne związki organiczne: kwasy nukleinowe, cukry, lipidy oraz białka, które mogą mieć wpływ na właściwości korozyjne biomateriału metalicznego.

W literaturze opisywane są wyniki badań wpływu białek na właściwości korozyjne różnorodnych biomateriałów, w tym: Ti i jego stopów [1-3], stopów CoCr [1,4] i stali [1,3,5]. Badania te prowadzone są głównie w obecności białek osocza krwi, z czego najczęściej stosowana jest albumina [6]. Wnioski dotyczące wpływu białek nie są jednoznaczne.

CORROSION RESISTANCE OF M30NW BIOMEDICAL ALLOY IN THE PRESENCE OF ALBUMIN AND γ -GLOBULIN

BARBARA BURNAT*, TADEUSZ BŁASZCZYK, ANDRZEJ LENIART

UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF CHEMISTRY,
DEPARTMENT OF INORGANIC AND ANALYTICAL CHEMISTRY,
TAMKA 12, 91-403 LODZ, POLAND

* E-MAIL: BURNAT@CHEMIA.UNI.LODZ.PL

Abstract

In this study we investigated the influence of bovine serum albumin and γ -globulin on the corrosion resistance of M30NW biomedical alloy. Corrosion measurements using electrochemical methods were carried out in deoxygenated buffered 0.9% NaCl solution at pH of 7.4. Corrosion tests were performed on day 0 (accelerated corrosion test) and within 84 days (long-term corrosion test). In accelerated corrosion tests numerous parameters characterizing the corrosion properties of investigated M30NW alloy were determined: corrosion potential E_{cor} , polarization resistance R_p , corrosion rate CR, passive current density $i_{0,4}$, breakdown potential E_b and repassivation potential E_{rep} . It was stated that addition of albumin and γ -globulin to buffered 0.9% NaCl solution causes a slight deterioration of corrosion resistance of M30NW alloy. The effect practically does not depend on the type and concentration of proteins. In long-term corrosion test were performed measurements of corrosion potential and Stern-Geary's characteristics. Based on obtained results it was stated that corrosion resistance of M30NW alloy increases in all solutions, but in the presence of albumin, the growth is weaker than in the presence of γ -globulin.

Keywords: biomaterials, proteins, corrosion, electrochemical methods

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 32-37]

Introduction

Preliminary evaluation of corrosion properties of metallic biomaterials is conducted in laboratory mostly using conventional electrochemical methods based on national and international standards. In this evaluation are mainly applied NaCl solutions and artificial physiological solutions (e.g. Ringer's, Tyrode's, Hank's solutions, etc.). These solutions contain mainly inorganic constituents present in cells, tissues and body fluids: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HCO_3^{2-} . The real human body fluids are also rich in various organic compounds: nucleic acids, sugars, lipids and proteins, which may affect the corrosion properties of metallic biomaterial.

In the literature there are some reports on the influence of proteins on the corrosion properties of various biomaterials: Ti and its alloys [1-3], CoCr alloys [1,4] and stainless steels [1,3,5]. The studies are mainly carried out in the presence of plasma proteins, of which albumin is the most commonly used [6]. Conclusions concerning the influence of proteins are not clear.

Jedni autorzy donoszą, że albumina wołowa BSA obniża szybkość korozji stali i stopów tytanowych [2,7], podczas gdy inni autorzy donoszą że BSA sprzyja roztwarzaniu tych stopów w wyniku tworzenia stabilnych kompleksów ze składnikami stopów [3,5].

Głównym celem pracy było określenie wpływu prostych białek na odporność korozyjną stopu biomedycznego M30NW. Pomiar korozyjny były prowadzone w buforowanym roztworze 0,9% NaCl o pH równym 7,4. Wpływ prostych białek na odporność korozyjną stopu został określony z użyciem białek reprezentujących dwie główne frakcje osocza: albuminy i γ -globuliny. Badania korozyjne przeprowadzone zostały w dniu 0 (badania przyspieszone korozji) i w ciągu 84 dni (badania korozji długoczasowej).

Materiały i metody

Próbki badanego stopu M30NW (AUBERT & DUVAL, Francja) miały kształt walców o średnicy 22 mm i grubości ok. 3 mm. Stop ten spełnia wymogi normy ISO 5832-9 [8]. Jego skład (% wag.) według certyfikatu producenta jest następujący: Cr (20,62), Ni (9,53), Mn (4,13), Mo (2,12), N (0,40), Nb (0,31), C (0,032) i Fe (reszta).

Powierzchnie próbek stopu były szlifowane na papierze ściernym SiC, polerowane mechanicznie na zawieszinie Al_2O_3 i oczyszczane w myjce ultradźwiękowej. W kolejnym etapie powierzchnie próbek były czyszczone chemicznie przez 1 min. w mieszaninie HF (2%), HNO_3 (10%) i H_2O (88%), a następnie poddawane dodatkowemu pasywowaniu poprzez gotowanie w wodzie destylowanej przez 10 min. Efektem takiego przygotowania powierzchni było skuteczne usunięcie materiału polerskiego i wytworzenie bardziej powtarzalnej warstwy pasywnej. Bezpośrednio przed pomiarami elektrochemicznymi próbki przemywano alkoholem etylowym i osuszano Ar. Pomiar korozyjny przeprowadzono w odtlenionym roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl) o pH = 7,4. Stałą wartość pH roztworu uzyskano dzięki zastosowaniu buforu fosforanowego. Wpływ obecności białek na właściwości korozyjne oceniano na podstawie dodatku albuminy i γ -globuliny osocza wołowego w dwóch stężeniach 1,0 i 10,0 g/l. Pomiar korozyjny przeprowadzono z użyciem potencjostatu - galvanostatu PGSTAT 30/1 (Autolab) w roztworach o temperaturze 37°C. Zastosowane metody elektrochemiczne to pomiar potencjału korozyjnego w otwartym obwodzie, metoda Stern - Geary'ego i charakterystyki potencjodynamiczne w szerokim zakresie polaryzacji anodowej. Badania przyspieszone korozji wykonywano w dniu przygotowania próbek (dzień 0). Badania korozji długoczasowej wykonywano w czasie 84 dni, w wybranych dniach (0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 i 84). Wszystkie wartości potencjałów podane są względem stosowanej elektrody kalomelowej w nasyconym roztworze NaCl ($E^\circ = 0,236$ V wzgl. NEW). Z kolei wszystkie wartości prądowe przeliczone zostały na jednostkę powierzchni - geometryczna robocza powierzchnia próbek wynosiła ok. 0,64 cm². Charakter zmian korozyjnych powstających na badanych próbkach został określony z zastosowaniem optycznego mikroskopu metalograficznego Mikrolab MMT800BT.

Wyniki i dyskusja

W badaniach przyspieszonych korozji wyznaczono szereg wielkości charakteryzujących właściwości korozyjne badanego stopu M30NW: potencjał korozyjny E_{cor} , opór polaryzacyjny R_p , szybkość korozji CR , gęstość prądu w obszarze pasywnym $i_{0,4}$ oraz potencjały przebicia E_b i repasywacji E_{rep} . Prezentowane wyniki są uśrednionymi wartościami wraz z odchyleniami standardowymi obliczonymi z pomiarów serii 4 próbek.

Some authors report that bovine serum albumin BSA diminishes the corrosion rate of stainless steels and titanium alloys [2,7] while other authors report that BSA promotes the dissolution of these alloys by forming stable complexes with the metallic components of the alloys [3,5].

The main objective of this study was to determine the effect of simple proteins on the corrosion resistance of M30NW biomedical alloy. Corrosion measurements were carried out in buffered 0.9% NaCl solution at pH of 7.4. The effect of simple proteins on the corrosion resistance of the alloy was determined using the most prevalent proteins of the blood plasma: albumin and γ -globulin. Corrosion tests were performed on day 0 (accelerated corrosion test) and within 84 days (long-term corrosion test).

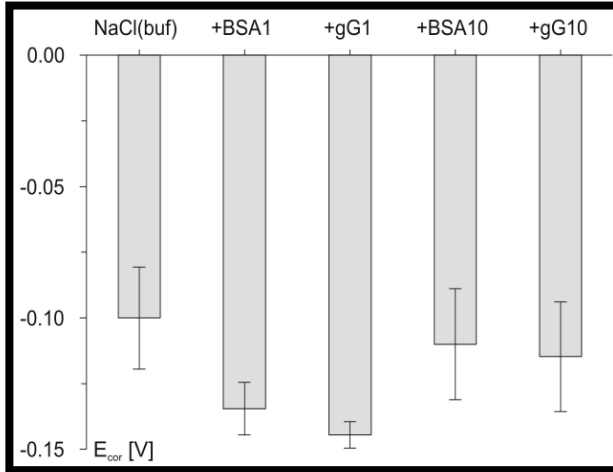
Materials and Methods

Samples of investigated M30NW alloy (AUBERT & DUVAL, France) had the shape of cylinder with a diameter of 22 mm and a thickness of about 3 mm. This alloy meets the requirements of ISO 5832-9 standard [8]. Its composition (% wt.) according to manufacturer's certificate is as follows: Cr (20.62), Ni (9.53), Mn (4.13), Mo (2.12), N (0.40), Nb (0.31), C (0.032) and Fe (rest).

The surfaces of the alloy samples were grinded on SiC abrasive paper, mechanical polished on Al_2O_3 slurry and cleaned in an ultrasonic bath. Next the samples surfaces were chemically cleaned for 1 min. in mixture of HF (2%), HNO_3 (10%) and H_2O (88%), and then additionally passivated by boiling in distilled water for 10 min. The effect of this surface finishing treatment was effective removal of polishing material and formation of more reproducible passive layer. Immediately prior to electrochemical measurements samples were rinsed with ethanol and dried with Ar. Corrosion measurements were carried out in deoxygenated physiological saline (0.9% NaCl) solution. Constant pH = 7.4 was achieved using phosphate buffer. The influence of proteins on the corrosion properties were evaluated based on the addition of albumin and γ -globulin from bovine serum at two concentrations: 1.0 and 10.0 g/l. Corrosion measurements were performed using potentiostat - galvanostat PGSTAT 30/1 (Autolab) in solutions at 37°C. Following electrochemical methods were used: measurement of corrosion potential in open circuit, Stern-Geary's method and potentiodynamic characteristics in wide range of anodic polarization. Accelerated corrosion tests were carried out for freshly prepared samples (day 0). Long-term corrosion tests were performed within 84 days, on selected days (0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84). All potentials reported in this paper are given versus used calomel electrode in saturated NaCl solution ($E^\circ = 0.236$ V vs. SHE). All current values were calculated per unit area - geometric working area of each sample was ca. 0.64 cm². The corrosion effects on investigated samples were determined using metallographic optical microscope Mikrolab MMT800BT.

Results and Discussions

In accelerated corrosion tests numerous parameters characterizing the corrosion properties of investigated M30NW alloy were determined: corrosion potential E_{cor} , polarization resistance R_p , corrosion rate CR , passive current density $i_{0,4}$, breakdown potential E_b and repassivation potential E_{rep} . The results presented in this paper are averaged values with standard deviations obtained from measurements of 4 samples.



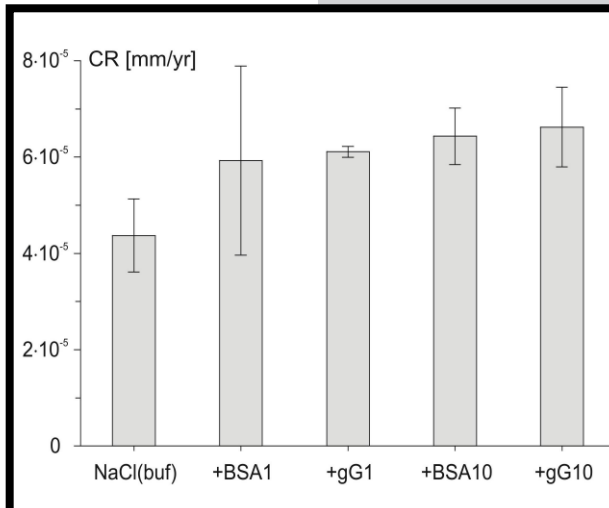
RYS. 1. Potencjał korozyjny stopu M30NW w roztworach zawierających białka.
FIG. 1. Corrosion potential of M30NW alloy in solutions containing proteins.

Na RYS. 1 przedstawiono wartości potencjału korozyjnego E_{cor} we wszystkich badanych roztworach.

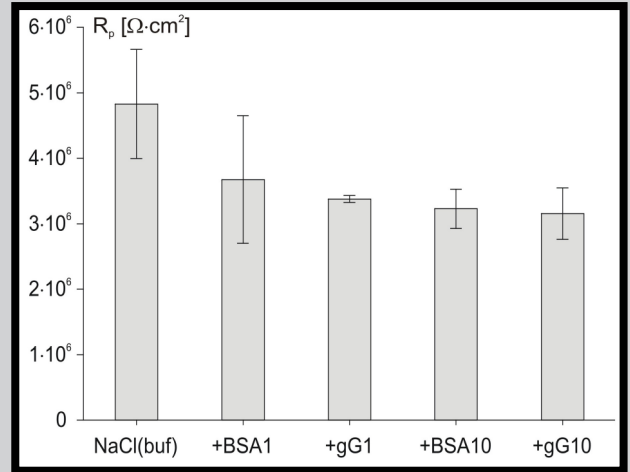
Średnia wartość potencjału korozyjnego E_{cor} stopu M30NW w buforowanym roztworze NaCl wynosi -0,100 V. Dodatek albuminy i γ -globuliny w stężeniu 1,0 g/l obniża ten potencjał o ok. 0,04 V, natomiast dodatek tych białek w stężeniu 10,0 g/l powoduje mniejsze obniżenie, jedynie o ok. 0,01 V. Jak widać, dodatek obydwu białek powoduje obniżenie potencjału E_{cor} , jednak stosunkowo duże odchylenia standardowe nie pozwalają na bardziej jednoznaczne powiązanie tego wpływu z rodzajem białka.

Charakterystyki Stern-Geary'ego mierzono w zakresie od $E_{cor} - 0,02$ V do $E_{cor} + 0,02$ V z szybkością zmian potencjału 0,3 mV/s. Z nachylenia tych charakterystyk wyznaczono wartości oporu polaryzacyjnego R_p , które przedstawione są na RYS. 2. Korzystając z wytycznych zawartych w normie ASTM G 102 – 89 [9], przy założeniu, że zachodząca korozja jest korozją równomierną, obliczono gęstości prądu korozyjnego i_{cor} oraz szybkości korozji CR. Obliczone wartości szybkości korozji CR przedstawiono na RYS. 3.

Stop M30NW w roztworze 0,9% NaCl bez dodatku białek charakteryzuje się oporem polaryzacyjnym R_p ok. $4,8 \cdot 10^6$ Ohm \cdot cm 2 . Dodanie do roztworu białek w ilości 1,0 g/l prowadzi do obniżenia wartości R_p ok. 1,3 i ok. 1,4 razy, odpowiednio dla albuminy i γ -globuliny. Dodanie białek w ilości 10,0 g/l również powoduje ok. 1,5-krotne obniżenie wartości R_p . Obniżenie wartości R_p skutkuje wzrostem szybkości korozji CR. Analiza zmian obydwu opisywanych wielkości wynikających z różnic w rodzajach białek i różnic w ich stężeniu, prowadzi do wniosku, że obydwa białka negatywnie wpływają na odporność korozyjną stopu. Ze względu na duże odchylenia standardowe nie można wyciągnąć bardziej kategoriycznych wniosków.



RYS. 3. Szybkość korozji stopu M30NW w roztworach zawierających białka.
FIG. 3. Corrosion rate of M30NW alloy in solutions containing proteins.



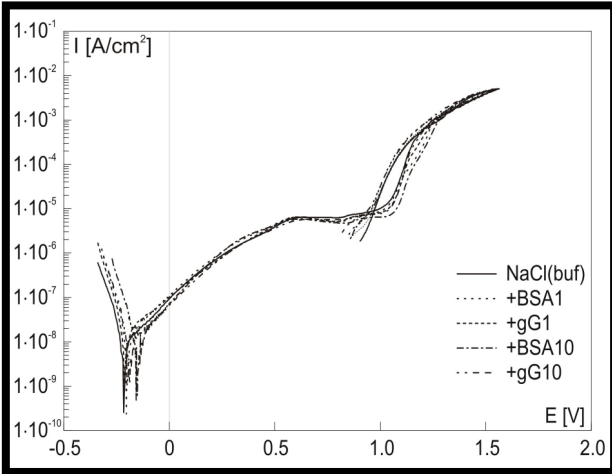
RYS. 2. Opór polaryzacyjny stopu M30NW w roztworach zawierających białka.
FIG. 2. Polarization resistance of M30NW alloy in solutions containing proteins.

In FIG. 1 are shown values of corrosion potential E_{cor} in all tested solutions.

The average value of corrosion potential E_{cor} of M30NW alloy in a buffered NaCl solution equals -0.100 V. Addition of albumin and γ -globulin in a concentration of 1.0 g/l reduces the potential ca. 0.04 V, while the addition of these proteins in the amount of 10.0 g/l causes a smaller reduction of only ca. 0.01 V. As it can be seen, the addition of both proteins causes a reduction of E_{cor} potential, but the relatively large standard deviations do not allow for a more explicit connection of this effect with the type of protein.

The Stern - Geary's characteristics were registered from $E_{cor} - 0.02$ V to $E_{cor} + 0.02$ V with scan rate of 0.3 mV/s. From the slope of those characteristics were determined values of polarization resistance R_p , which are shown in FIG. 2. According to standard ASTM G 102 – 89 [9], assuming that the occurring corrosion is uniform corrosion, there were determined values of corrosion current density i_{cor} and corrosion rate CR. Obtained values of CR are presented in FIG. 3.

M30NW alloy in 0.9% NaCl solution without addition of proteins is characterized by the polarization resistance R_p of about $4,8 \cdot 10^6$ Ohm \cdot cm 2 . The addition of proteins to solution in an amount of 1.0 g/l leads to lower R_p values ca. 1.3 and ca. 1.4 times for albumin and γ -globulin, respectively. The addition of proteins at concentration of 10.0 g/l also causes decreasing of R_p values ca. 1.5 times. The lower values of R_p results in higher values of corrosion rate CR. Analysis of changes in both described quantities due to difference in protein type and difference in their concentration, leads to the conclusion that both proteins negatively affect the corrosion resistance of the alloy. Due to the large standard deviations can not be drawn more categorical conclusions.



RYS. 4. Charakterystyki potencjodynamiczne stopu M30NW w roztworach zawierających białka.
FIG. 4. Potentiodynamic characteristics of M30NW in solutions containing proteins.

Charakterystyki potencjodynamiczne mierzono polaryzując stop z szybkością 1 mV/s od potencjału startowego równego $E_{cor} - 0,20$ V w kierunku anodowym aż do potencjału, przy którym gęstość natężenia prądu osiągała wartość 5 mA/cm². Następnie zmieniano kierunek polaryzacji i powracano do potencjału startowego. Zarejestrowane charakterystyki potencjodynamiczne przedstawiono na RYS. 4 (dla większej przejrzystości powrotne gałęzie charakterystyk zostały obcięte).

Z przedstawionych krzywych widać, że dodatek białek do buforowanego roztworu 0,9% NaCl nie wpływa znacząco na ich przebieg - charakterystyki zmierzone w roztworach zawierających białka mają niemal identyczny kształt jak krzywe w buforowanym roztworze NaCl. Wszystkie charakterystyki potencjodynamiczne mają przebieg typowy dla korozji lokalnej. Na gałęzi powrotnej pojawia się pętla histerezy świadcząca o rozwijaniu się powstałych zniszczeń korozyjnych. W oparciu o analizę mikroskopową powierzchni dla wszystkich roztworów stwierdzono występowanie jedynie w miejscu styku próbki z uszczelką zniszczeń charakterystycznych dla korozji wżerowej. Na pozostałej powierzchni nie stwierdzono żadnych innych ubytków korozyjnych. Zarówno rodzaj jak i stężenie dodanych białek nie powoduje zmian w charakterze i wielkości powstających zniszczeń.

Na podstawie charakterystyk potencjodynamicznych przedstawionych na RYS. 4 wyznaczono: gęstość prądu w zakresie pasywnym przy arbitralnie wybranym potencjale równym $E=0,4$ V $i_{0,4}$, potencjał przebicia E_b i potencjał repasywacji E_{rep} . Wielkości te zostały zgromadzone w TABELI 1.

Na podstawie danych zgromadzonych w TABELI 1 można stwierdzić, że dodatek białka do buforowanego roztworu 0,9% NaCl w niewielkim stopniu wpływa na wartości gęstości prądu w obszarze pasywnym $i_{0,4}$. W obecności albuminy i γ -globuliny w obydwu stężeniach odczytane wartości $i_{0,4}$ są ok. 20-40% wyższe niż w roztworze bez białek. Uzyskany wynik jest zgodny ze zmianami R_p i CR otrzymanymi z charakterystyk Stern-Geary'ego. Podobnie jak przy analizie R_p i CR tak i tutaj należy zaznaczyć, że duże wartości odchyłek standardowych porównywalne są ze zmianami spowodowanymi obecnością w roztworze albuminy i γ -globuliny w obu stężeniach. Analizując zmiany wartości potencjałów przebicia E_b i repasywacji E_{rep} nie można dostrzec jednoznacznego wpływu zarówno rodzaju białka jak i jego stężenia na te wielkości.

TABELA 1. Wartości wielkości korozyjnych odczytanych z charakterystyk potencjodynamicznych.
TABLE 1. Values of corrosion quantities determined from potentiodynamic characteristics.

roztwór solution	$i_{0,4}$ [A/cm ²]	E_b [V]	E_{rep} [V]
NaCl(buf)	$(2.00 \pm 0.29) \cdot 10^{-6}$	1.051 ± 0.002	0.971 ± 0.002
+BSA1	$(2.50 \pm 0.25) \cdot 10^{-6}$	1.040 ± 0.010	0.944 ± 0.003
+gG1	$(2.33 \pm 0.44) \cdot 10^{-6}$	1.055 ± 0.002	0.951 ± 0.010
+BSA10	$(2.78 \pm 0.08) \cdot 10^{-6}$	1.056 ± 0.014	0.922 ± 0.005
+gG10	$(2.42 \pm 0.15) \cdot 10^{-6}$	1.054 ± 0.004	0.937 ± 0.037

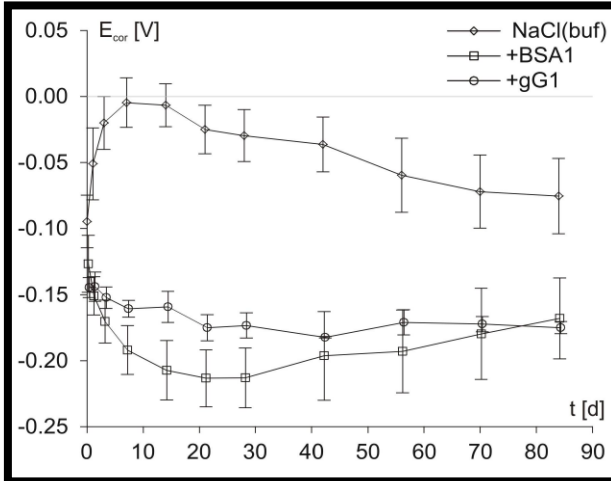
Potentiodynamic characteristics were measured with scan rate of 1 mV/s by polarization from starting potential of $E_{cor} - 0.20$ V in anodic direction up to potential at which current density reached value of 5 mA/cm². Next the polarization direction was reversed and returned to starting potential. Registered potentiodynamic characteristics are shown in FIG. 4 (for better transparency backward branches of characteristics were cut off).

The presented curves show that the addition of proteins to the buffered 0.9% NaCl solution did not significantly affect their course - the characteristics measured in solutions containing proteins have almost identical shape as the curves in a buffered solution of NaCl. All potentiodynamic characteristics have a shape typical for localized corrosion. On the backward branch there is a hysteresis loop indicating a development of the arising corrosion damage. Based on the microscopic analysis of the surface for all solutions were found only damage characteristic of pitting corrosion in the place of contact of the sample with the gasket. On the remaining area, there was no other damage. Both the type and concentration of added proteins do not change the nature and size of the arising damage.

On the basis of potentiodynamic characteristics shown in FIG. 4 were determined: current density in the passive range at arbitrary chosen potential $E=0.4$ V $i_{0,4}$, breakdown potential E_b and repassivation potential E_{rep} , whose values are collected in TABLE 1.

Based on data collected in TABLE 1 can be concluded that the addition of proteins to buffered 0.9% NaCl solution has a little effect on the value of current density in the passive range $i_{0,4}$. In the presence of albumin and γ -globulin in both concentrations obtained values of $i_{0,4}$ are approximately 20-40% higher than in solution without proteins. The result is compatible with the changes in R_p and CR obtained from the Stern-Geary's characteristics. Just as in the analysis of R_p and CR it should be noted here that the large standard deviations are comparable with the changes caused by the presence in solution of albumin and γ -globulin in both concentrations. Analyzing the changes in breakdown E_b and repassivation potentials E_{rep} no clearly effect of protein type and its concentration on these parameters may be stated.

In long-term corrosion studies every time on days 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84 corrosion potential and Stern-Geary's characteristics were measured. In FIG. 5, 6 and 7 are presented the dependences of E_{cor} , R_p and CR versus immersion time in buffered 0.9% NaCl solution and solutions containing albumin and γ -globulin at concentration of 1.0 g/l. The decision to limit the research to only one concentration was taken on the basis of the above described results of accelerated corrosion test, in which there was no effect of protein concentration on the corrosion properties of the alloy. The results presented in the figures are averaged values from the measurements of a series of 3 samples.



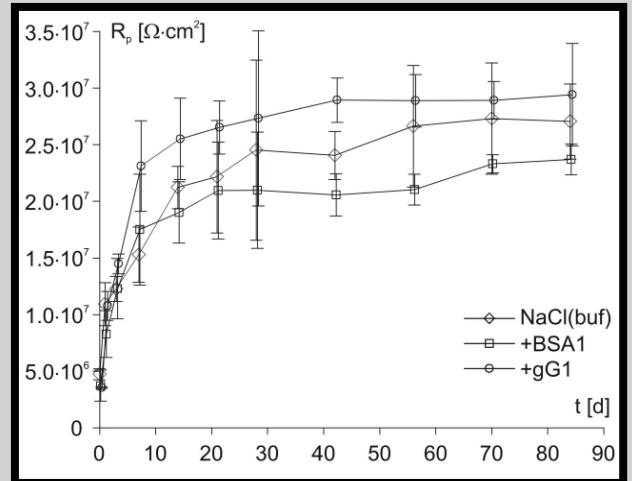
RYS. 5. Zależność potencjału korozyjnego od czasu.

FIG. 5. Dependence of corrosion potential versus immersion time.

W badaniach korozji długoczasowej każdorazowo w dniach 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 i 84 wykonywano pomiary potencjału korozyjnego i charakterystyk Stern-Geary'ego. Na RYS. 5, 6 i 7 przedstawione są zależności od czasu potencjału korozyjnego E_{cor} , oporu polaryzacyjnego R_p i szybkości korozji CR badanego stopu w buforowanym roztworze 0,9% NaCl oraz w roztworach zawierających albuminę i γ -globulinę, ale tylko w stężeniu 1,0 g/l. Decyzja o ograniczeniu badań tylko do jednego stężenia podjęta została na podstawie wyżej opisanych wyników badań przyspieszonych korozji, w których nie stwierdzono wpływu stężenia białek na właściwości korozyjne stopu. Przedstawiane na rysunkach wyniki są uśrednionymi wartościami z pomiarów serii 3 próbek.

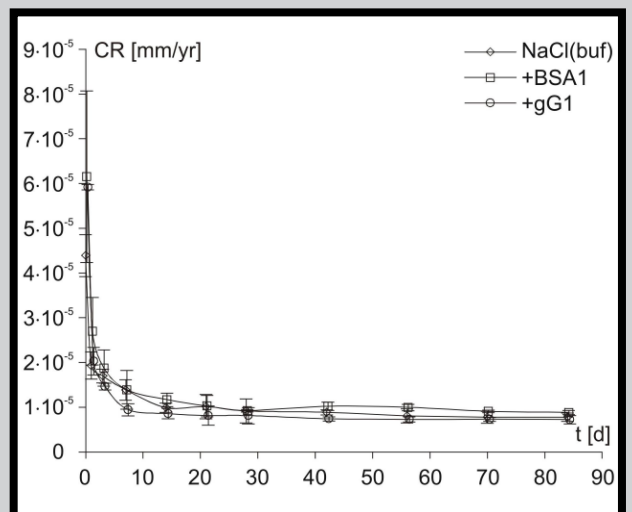
Analizując zależność E_{cor} od czasu wyraźnie widać, że tendencja zmian E_{cor} jest inna w buforowanym roztworze 0,9% NaCl i w roztworach zawierających białka. W roztworze nie zawierającym białek w ciągu pierwszych 7 dni kontaktowania się stopu z roztworem potencjał E_{cor} rośnie o ok. 0,09 V, a następnie obniża się aż do wartości ok. -0,08 V w ostatnim dniu. W roztworze zawierającym białka potencjał E_{cor} obniża się w ciągu 20-30 dni o ok. 0,09 V dla albuminy i o ok. 0,03 V dla γ -globuliny, osiągając zbliżoną wartość ok. -0,17 V w ostatnim dniu. Znaczne obniżenie wartości E_{cor} w roztworach z dodatkiem białek można powiązać z ich oddziaływaniem z powierzchnią stopu, np. adsorpcją, co sygnalizuje Omanovic [5]. Dane literaturowe wskazują, że adsorpcja białek do powierzchni biomateriału zachodzi natychmiast po zanurzeniu [1]. Zarówno albumina jak i γ -globulina w roztworze o pH = 7,4 naładowane są ujemnie i ich adsorpcja może wywołać obserwowane zmiany potencjału korozyjnego zarówno w dniu 0 (RYS. 1) jak i w ciągu 84 dni (RYS. 5). Jednakże chcemy zaznaczyć, że wyniki dodatkowych badań impedancyjnych nie potwierdziły adsorpcji obydwu białek w dniu 0 [10].

Zmiany oporu polaryzacyjnego R_p przedstawione na RYS. 6 pokazują, że we wszystkich badanych roztworach R_p rośnie szybko w pierwszych 10-30 dniach. W następnych dniach wzrost R_p jest już znacznie wolniejszy. Od 14 dnia ustala się relacja między wartościami R_p w poszczególnych roztworach: R_p w roztworze z dodatkiem γ -globuliny > R_p w roztworze buforowanym 0,9% NaCl > R_p w roztworze z dodatkiem albuminy. Zmiany R_p skutkują zmianami szybkości korozji CR , które przedstawione są na RYS. 7. Jak widać, CR maleje gwałtownie (ok. 6 razy) w pierwszych 10-30 dniach kontaktowania się stopu z roztworami korozyjnymi.



RYS. 6. Zależność oporu polaryzacyjnego od czasu.

FIG. 6. Dependence of polarization resistance versus immersion time.



RYS. 7. Zależność szybkości korozji od czasu.

FIG. 7. Dependence of corrosion rate versus immersion time.

Analyzing the dependence of E_{cor} versus time it is evident that the trend of E_{cor} changes is different in buffered 0.9% NaCl solution and in solutions containing proteins. In solution without proteins in the first 7 days of immersion E_{cor} increases by about 0.09 V, and then decreases up to approximately -0.08 V on the last day. Whereas in solutions containing protein E_{cor} potential decreases within 20-30 days by about 0.09 V for albumin and approximately 0.03 V for γ -globulin, reaching a similar value of about -0.17 V on the last day. A significant reduction of E_{cor} value in solutions with proteins may be related to their interaction with the alloy surface, such as adsorption, which reports Omanovic [5]. Literature data inform that the adsorption of proteins to the biomaterial surface occurs immediately after immersion [1]. Both albumin and γ -globulin in solution at pH = 7.4 are negatively charged and their adsorption may cause the observed changes in corrosion potential, both on day 0 (FIG. 1) and during 84 days (FIG. 5). However, we want to point out that the results of additional impedance studies have not confirmed the adsorption of both proteins on day 0 [10].

Changes in polarization resistance R_p , presented in FIG. 6 show that in all test solutions R_p increases rapidly in the first 10 - 30 days. In the next days R_p growth is much slower.

Następnie CR zmniejsza się znacznie wolniej, uzyskując w 84 dniu w stosunku do buforowanego roztworu 0,9% NaCl wartość o ok. 13% wyższą w roztworze zawierającym albuminę i ok. 7% niższą w roztworze zawierającym γ -globulinę. Podobne zmiany oporu polaryzacyjnego R_p i szybkości korozji CR zarejestrowane były w naszych wcześniejszych badaniach korozji długoczasowej stopu Rex734 w roztworze 0,5 M NaCl i roztworze Tyrode [11]. Stop ten również spełnia wymogi standardu ISO 5832-9.

Analiza mikroskopowa powierzchni stopu M30NW po 84 dniach kontaktu z roztworami nie pokazała żadnych charakterystycznych uszkodzeń korozyjnych. Potwierdza to słuszność założenia o zachodzeniu korozji równomiernej tego stopu w potencjale korozyjnym we wszystkich badanych roztworach.

Wnioski

Podsumowując opisane wyżej wyniki badań przyspieszonych korozji można stwierdzić co następuje.

- dodatek albuminy i γ -globuliny do buforowanego roztworu 0,9% NaCl powoduje niewielkie pogorszenie odporności korozyjnej stopu M30NW. Pogorszenie tej odporności praktycznie nie zależy od rodzaju i stężenia białek;
- dodatek białek nie ma wpływu na charakterystyki potencjodynamiczne przy dalekiej polaryzacji anodowej i na zachodzącą przy tej polaryzacji korozję wżerową.

Na podstawie badań korozji długoczasowej można stwierdzić, że:

- odporność korozyjna stopu M30NW wzrasta we wszystkich roztworach, z tym że w obecności albuminy wzrost ten jest słabszy niż w obecności γ -globuliny;
- wpływ obydwu białek wyraźnie ujawnia się w innym przebiegu zmian parametrów korozyjnych stopu w czasie w stosunku do buforowanego roztworu 0,9% NaCl, co można powiązać z adsorpcją obydwu białek na powierzchni stopu.

Podziękowania

Badania wykonane zostały w ramach grantu NCN Nr N N507 501339. Stop biomedyczny M30NW zakupiony został w firmie MEDGAL (Białystok, Polska).

Piśmiennictwo

- [1] Karimi S., Nickchi T., Alfantazi A.: Effects of bovine serum albumin on the corrosion behaviour of AISI 316L, Co-28Cr-6Mo, and Ti-6Al-4V alloys in phosphate buffered saline solutions. *Corros. Sci.* 53 (2011) 3262-3272.
- [2] Huang H.: Effect of fluoride and albumin concentration on the corrosion behavior of Ti-6Al-4V alloy, *Biomaterials* 24 (2003) 275-282.
- [3] Williams R.L., Brown S.A., Merritt K.: Electrochemical studies on the influence of proteins on the corrosion of implant alloys, *Biomaterials* 9 (1988) 181-186.
- [4] Vidal C.V., Muñoz A.I.: Study of the adsorption process of bovine serum albumin on passivated surfaces of titanium biomedical alloy, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 8445-8452.
- [5] Omanovic S., Sharon G. Roscoe Electrochemical Studies of the Adsorption Behavior of Bovine Serum Albumin on Stainless Steel. *Langmuir* 15 (1999) 8315-8321.
- [6] Afonso M.L.C.A., Villamil Jaimes R.F.V., Areas E.P.G., Capri M.R., E. Oliveira, Agostinho S.M.L.: The influence of albumin on the anodic dissolution of chromium present in UNS S31254 stainless steel in chloride environment. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 317 (2008) 760-763.

Since day 14 the relationship between the values of R_p in different solutions is as follows: R_p in solution with the addition of γ -globulin $> R_p$ in buffered 0.9% NaCl solution $> R_p$ in solution with the addition of albumin. The changes of R_p value result in changes of corrosion rate CR , which are shown in FIG. 7. As can be seen, the CR decreases rapidly (about 6 times) in the first 10-30 days of the alloy contact with test solutions. Then the CR decreases much slower, resulting in day 84 value of ca. 13% higher and ca. 7% lower in a solution containing albumin and γ -globulin, respectively, in relation to the buffered 0.9% NaCl solution. Similar changes of R_p and CR were registered in our previous studies of long-term corrosion of the Rex734 alloy in a 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions [11]. This alloy also belongs to ISO 5832-9 standard.

Microscopic analysis of M30NW alloy surface after 84 days of contact with the corrosion solutions did not show any characteristic corrosion damage. This confirms the validity of the assumption of uniform corrosion of the alloy at corrosion potential in all test solutions.

Conclusions

Summarize results of accelerated corrosion tests described above can be stated that:

- addition of albumin and γ -globulin to buffered 0.9% NaCl solution causes a slight deterioration of corrosion resistance of M30NW alloy. The effect practically does not depend on the type and concentration of proteins;
- addition of proteins does not affect the potentiodynamic characteristics in wide anodic polarization and pitting corrosion occurring then.

Based on results of long-term corrosion tests can be concluded that:

- corrosion resistance of M30NW alloy increases in all solutions, but in the presence of albumin, the growth is weaker than in the presence of γ -globulin;
- impact of both proteins is clearly revealed in a different time-dependence of changes of alloy corrosion parameters in relation to the buffered 0.9% NaCl solution, which can be associated with adsorption of both proteins on the surface of the alloy.

Acknowledgments

The investigations were supported by grant No. N N507 501339 of National Science Centre. The M30NW biomedical alloy was bought from MEDGAL (Białystok, Poland).

References

- [7] Merrit K., Brown S.: Effect of proteins and pH on fretting corrosion and metal ion release, *J. Biomed. Mater. Res.* 22 (1988) 111-120.
- [8] ISO Standard 5832-9:2007 Implants for surgery - Metallic materials - Part 9: Wrought high nitrogen stainless steel
- [9] ASTM G 102-89:2004 Standard Practice for Calculation of Corrosion Rates and Related Information from Electrochemical Measurements
- [10] Burnat B., Błaszczuk T., Leniart A.: Impedance studies of the influence of proteins on the electrochemical properties of biomedical steel ISO 5832-9. 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Prague 2012
- [11] Burnat B., Błaszczuk T., Leniart A., Scholl H., Klimek L.: Long-time corrosion of Rex 734 and Panacea P558 alloys in 0.5 M NaCl and Tyrode's solutions *Engineering of Biomaterials* 63-64 (2007) 28-31.

OCENA WYTRZYMAŁOŚCI MECHANICZNEJ KLEJÓW ORTODONTYCZNYCH W TESTACH BEZPOŚREDNICH

BARTŁOMIEJ PAWLUS^{1*}, ANDRZEJ DYSZKIEWICZ², MIŁOŚ ŚPIDLEN¹

¹ ZAKŁAD ORTODONCJI, KLINIKA STOMATOLOGICZNA, PALACKÉHO 12, 772 00 OŁOMUNIEC, REPUBLIKA CZEKA

² INSTYTUT FIZJOTERAPII POLITECHNIKI OPOLSKIEJ, LABORATORIUM BIOTECHNOLOGII „LABIOT”, UL. GOŹDZIKÓW 2, 43-400 CIESZYN, POLSKA

* EMAIL: PAWBART@GMAIL.COM

Streszczenie

Celem pracy było stworzenie stanowiska pomiarowego do porównania i oceny właściwości wytrzymałościowych klejów wykorzystywanych do mocowania zamków ortodontycznych na zębach.

Utworzono stanowiska pomiarowe dla badań przeprowadzanych na maszynie wytrzymałościowej z tensometrem oporowym, miernikiem wagowym oraz z serwomechanizmem, umożliwiającą przeprowadzenie statycznych prób wytrzymałościowych. Autorski system pomiarowy umożliwia pozaustrojową ocenę maksymalnych naprężeń ścinających, rozciągających i skręcających, działających na zamek ortodontyczny, zespolony z powierzchnią zęba. Badaniom próbnym poddano następujące materiały łączące: Transbond XT 3M, Light Bond Reliance, Enlight Ormco. Sporządzono 90 próbek z usuniętymi zębami przedtrzonowymi ludzkimi. Utworzono losowo 3 grupy po 10 próbek. Każda grupa została przypisana do odpowiedniej metody badawczej. Badania przeprowadzono in vitro w temperaturze 24°C w godzinę po przytwierdzeniu zamka.

Dla próby ścinania najwyższe wartości średnich naprężeń granicznych wykazał Transbond XT. Najniższe wartości średnie ustalono dla Enlight Ormco. Dla próby rozciągania najwyższe wartości średnich naprężeń granicznych wykazał Enlight Ormco. Najniższe wartości średnie ustalono dla Transbond XT 3M. Najwyższe średnie wartości dla momentu skręcającego, przy którym doszło do zerwania materiału zarejestrowano dla Light Bond Reliance. Najniższe wartości średnie wykazał Enlight Ormco.

Wyniki testów tensometrycznych wykazywały w badanych materiałach zbieżny trend największej odporności na działanie sił skręcających, mniejszy na działanie sił ścinających i najmniejszy na wpływ sił rozciągających. Rozbicie wypadkowej na poszczególne składowe naprężenia odzwierciedla naturalne zachowania wytrzymałościowe materiału łączącego z zamkami ortodontycznymi.

Słowa kluczowe: kleje ortodontyczne, siła wiązania, ścinanie, skręcanie, rozciąganie

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 38-44]

EVALUATION OF MECHANICAL STRENGTH OF ORTHODONTIC ADHESIVES IN DIRECT TESTS

BARTŁOMIEJ PAWLUS^{1*}, ANDRZEJ DYSZKIEWICZ², MIŁOŚ ŚPIDLEN¹

¹ DEPARTMENT OF ORTHODONTICS, CLINIC OF DENTAL MEDICINE, MEDICAL FACULTY, PALACKÉHO 12, 772 00 OLOMOUC, CZECH REPUBLIC

² INSTITUTE OF PHYSIOTHERAPY, UNIVERSITY OF OPOLE, BIOTECHNOLOGY LABORATORY „LABIOT”, UL. GOŹDZIKÓW 2, 43-400 CIESZYN, POLAND

* EMAIL: PAWBART@GMAIL.COM

Abstract

New materials for fastening teeth braces enabled more common use of the fixed appliances. Binding strength is being transferred to the teeth by orthodontic brackets fitted with linking material. A common problem is brackets peeling off. Information about the material strength is essential for adhesive selection.

The aim of the study was to develop measurement system for comparison and estimation of binding properties of the bond used for orthodontic appliances.

Measurement system allows to evaluate maximum shear, tension and torsion stress.

The following materials were tested in the study: 3M Transbond XT, Reliance Light Bond, Ormco Enlight.

90 samples of human premolars were made. Three groups of 10 samples were created. Each group was assigned to the particular method and to the adhesive test.

The maximal and minimal values of average shear stress were demonstrated with Transbond XT and Ormco Enlight. Tension stress showed maximal mean values for Ormco Enlight, minimal for 3M Transbond XT. The maximal mean values of torsion were recorded for Reliance Light Bond, the minimal for Ormco Enlight.

The results showed the greatest resistance convergent trend for torsion, less significant for shear and the least influence of tension forces. Components of the net force reflect the natural behavior of the orthodontic adhesives.

Keywords: orthodontic bonds, bond strength, torsion, shear, tension

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 38-44]

Introduction

New materials for fastening teeth braces enabled more common use of the fixed appliances [1,2]. Binding strength of the material is being transferred to the teeth by orthodontic brackets fitted with linking material. A common problem that occurs during the treatment is brackets peeling off as the result of occlusal forces, inadequate bracket bonding or the enamel structure not engaging in the etching [3]. Information about the material strength is essential for adhesive selection in specific clinical circumstances. Binding strength values depend not only on the connecting material, but also on the bracket base structure, the enamel surface, measurement and bond application methods. Too strong adhesive may destroy the enamel prisms during brackets removal (above 10 MPa) [4,5].

Wstęp

Dzięki nowym materiałom do mocowania elementów aparatu ortodontycznego na zębach znacznie wzrosła możliwość leczenia z zastosowaniem aparatów stałych [1,2]. Siła używana w leczeniu jest przenoszona na zęby poprzez zamki ortodontyczne, mocowane z użyciem materiałów łączących. Częstym problemem występującym podczas leczenia jest odklejenie zamków, powodowane między innymi działaniem sił zgryzowych, nieprawidłowym postępowaniem podczas klejenia zamków lub strukturą szkliwa niepoddającego się wytrawieniu [3]. Informacja o wytrzymałości poszczególnych materiałów łączących stanowi istotną pomoc w wyborze odpowiednich klejów w określonych przypadkach klinicznych. Wartości wytrzymałościowe spojenia zależą nie tylko od materiału łączącego, ale również od podstawy zamka, powierzchni szkliwa, metod pomiarowych i sposobu przyklejania. Zbyt duża siła wiązania kleju może spowodować oderwanie przyzmatów szkliwa podczas zdejmowania zamków (powyżej 10 MPa) [4,5].

Celem pracy było stworzenie stanowiska pomiarowego do porównania i oceny właściwości wytrzymałościowych klejów wykorzystywanych do mocowania zamków ortodontycznych na zębach.

Materiały i metody

Utworzono stanowiska pomiarowe dla badań przeprowadzanych na maszynie wytrzymałościowej z tensometrem oporowym, miernikiem wagowym oraz z serwo mechanizmem, umożliwiającą przeprowadzenie statycznych prób wytrzymałościowych. Prototyp umożliwił ocenę wytrzymałości zespołów zamków ortodontycznych z powierzchnią szkliwa zębów ludzkich, na trzy rodzaje sił mechanicznych, w warunkach pozaustrojowych, w krótkim terminie po ekstrakcji. Autorski system pomiarowy (RYS. 1) umożliwia pozaustrojową ocenę maksymalnych naprężeń ścinających, rozciągających i skręcających, działających na zamek ortodontyczny, zespolony z powierzchnią zęba. Urządzenie składa się z:

- (1) imaka, w którym zamocowana jest forma z żywicą mocującą ząb, z przyklejonym zamkiem,
- (2) ostrza lub obejmy dopasowanej do kształtu zamka, połączonego z elementem reakcyjnym i przetwornikiem tensometrycznym,
- (3) napędu liniowego z silnikiem krokowym sterowanym za pomocą programu PAL-PCV1.5,
- (4) modułu pomiarowego.

Imak jest elementem mechanicznym systemu pomiarowego, który został zaopatrzony w szczęki oraz system docisku, służący do szybkiego i trwałego mocowania form metalowych, zawierających zatopiony w żywicy ząb z przyklejonym zamkiem.

Ostrze jest elementem wykonanym ze stali szlachetnej – OH18N9 (DIN- X5 Cr Ni 18-10), ściśle dopasowanym do wymiarów brzozy centralnej zamka. Umożliwia działanie na zamek sił ścinających i skręcających (RYS. 2 a,b).

Obejma jest układem dwuostrzowym, zaczepianym na wieńcu zamka, umożliwiającym działanie sił rozciągających (RYS. 2 c). Element kierunkujący jest regulowanym systemem dźwigniowym, który umożliwia działanie na próbkę poprzez ostrze siłami: skręcającymi i ścinającymi (RYS. 3 a,b) oraz poprzez obejmę, siłami rozciągającymi (RYS. 3 c).

Zastosowany tensometr zbudowany jest z elementu sprężystego oraz czujników tensometrycznych.

Aim of the study was to develop optimal measurement system for comparison and estimation of binding properties of the bond used for orthodontic appliances fixation on teeth.

Materials and Methods

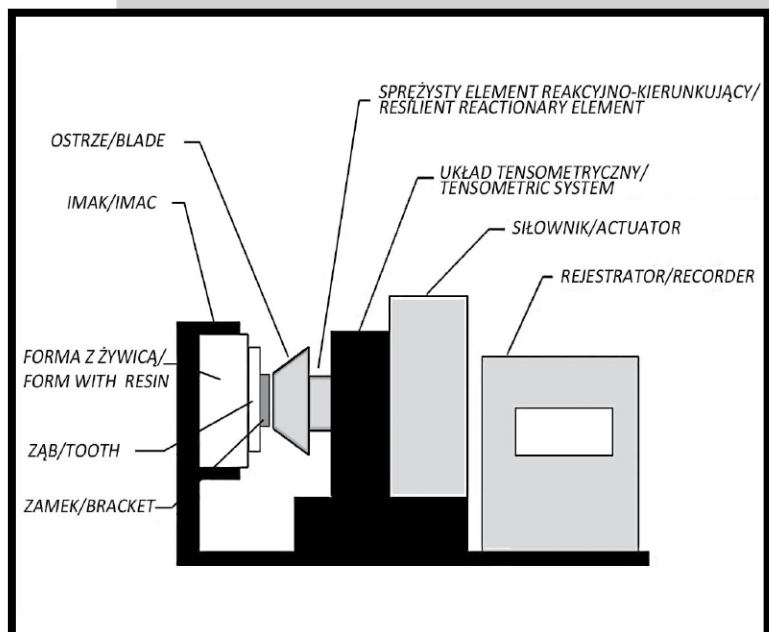
The measurement system tested in the study consists of a strain gauge resistance, a weight gauge and a servomechanism for static strength tests. The prototype enables extracorporeal assessment of anastomotic strength of orthodontic brackets to the human enamel surface and three mechanical forces shortly after extraction. Original measurement system (FIG. 1) allows to evaluate extracorporeal maximum shear stress, tension and torsion, acting on the orthodontic brackets attached to the tooth surface. The device consists of:

- (1) Imac, which is attached to the resin tooth clamping form with a stuck zipper,
- (2) Clamp or blade molded to the shape of a buckle, coupled with the reactionary element and the load cell transducer,
- (3) Linear drive stepper motor controlled by the PAL-PCV1.5,
- (4) Measurement module.

A tool holder is the part of a mechanical measurement system, which is fitted with a jaw and a clamping system for quick and permanent fixation of the metal forms embedded in a resin containing a tooth with a stuck zipper. The blade is made of stainless steel OH18N9 (DIN- X5 Cr Ni 18-10) closely matching the dimensions of the central groove of the bracket. It transmits torsion and shear forces to the brackets (FIG. 2 a,b).

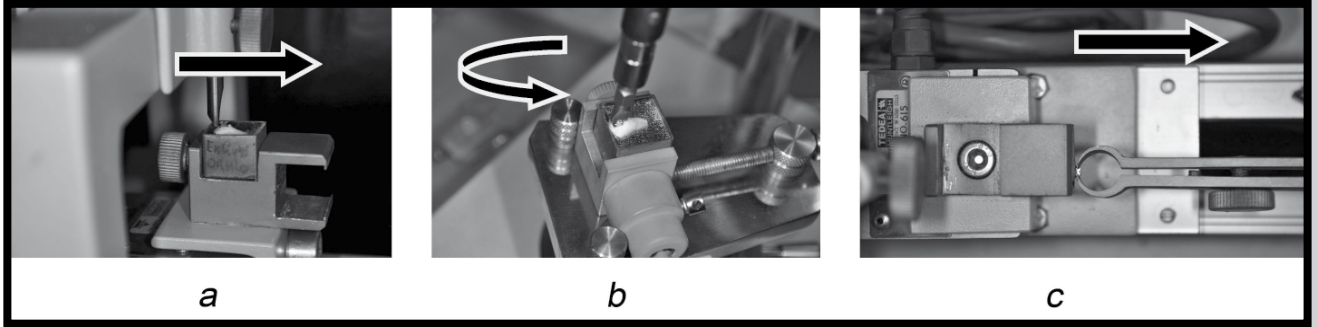
A clamp is a double blade system, hook-on rim lock, enabling the action of tension forces (FIG. 2 c). A guiding element is an adjustable lever system which allows sample operation through the blade forces: torsion and shear (FIG. 3 a,b) and through the bracket, tension forces (FIG. 3 c).

The applied strain gauge is made of an elastic element and the strain gauge sensors.

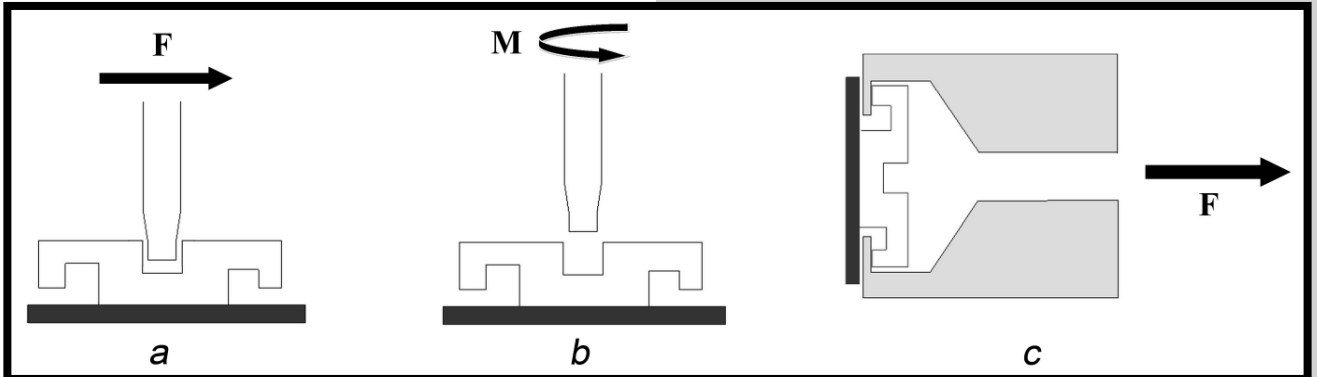


RYS. 1. Schemat blokowy urządzenia do pomiaru wartości sił zrywających zamki.

FIG. 1. Block diagram of the measurement system for the bracket breaking forces.



RYS. 2. System przenoszący siły z elementu kierującego na zamek: (a, b) ostrze; (c) obejmą.
 FIG. 2. The system that transfers forces from the directional element to the bracket: (a, b) blade, (c) clamp.



RYS. 3. Schemat systemu przenoszącego siły z elementu kierującego na zamek: (a, b) ostrze; (c) obejmą.
 FIG. 3. A scheme of system that transfers forces from the directional element to the bracket: (a, b) blade, (c) clamp.

Element sprężysty posiada zdolność do wielokrotnego, sprężystego odkształcania się pod działaniem siły oraz powtarzalnego powrotu do parametrów wyjściowych z zachowaniem stabilnej charakterystyki liniowej, znacznie poniżej swej granicy sprężystości. Jako element sprężysty dla testów określających moment obrotowy zastosowano analogowy dynamometr japońskiej firmy Tohnichi FTD50CN2-S wykalibrowany w $\text{cN}\times\text{m}$ w zakresie od 1-50, z błędem pomiarowym 0,01 $\text{cN}\times\text{m}$. Do testów ścinania i rozciągania zastosowano tensometr oporowy firmy Vishay model 615 Tedeá Huntleigh. Rezystancyjne przetworniki tensometryczne należą do grupy konwerterów mechoelektrycznych, w których dochodzi do przetworzenia chwilowych odkształceń geometrycznych na zmienną wartość płynącego prądu, na skutek zmiany rezystancji materiału. Bezpośrednią przyczyną zmiany rezystancji jest deformacja sieci struktury krystalicznej materiału przewodzącego. Do czynników warunkujących jego żywotność należy histereza sprężysta, opóźnienie sprężyste, plastyczne płynięcie materiału, zmęczenie materiału, naprężenia i odkształcenia termiczne. Na elemencie sprężystym rejestruje się względny przyrost parametru mierzonego R, wyrażając go jako iloczyn względnej zmiany parametrów liniowych i współczynnika czułości odkształceniowej.

W urządzeniu pomiarowym zastosowano elektromechaniczny napęd liniowy, zaopatrzonego w silnik krokowy firmy ISEL, zasilany standardowym zasilaczem IT 116G, sterowanym za pomocą programu narzędziowego PAL-PCV1,5. Powyższy program narzędziowy był obsługiwany z ekranu dialogowego zaimplementowanego w środowisku „Delphi Professional 7.0”, umożliwiając regulację prędkości przesuwu obejmą lub ostrza, automatyczne zatrzymanie po otrzymaniu sygnału z tensometru (zerwanie zamka) oraz ręczne pozycjonowanie ostrza lub obejmą po wymianie kolejnej próbki.

The spring element is capable of multiple elastic deformations under action of force and repetitive returns to the output parameters with stable linear characteristic well below its elastic minimal threshold. Analog torque dynamometer Japanese company Tohnichi FTD50CN2-S $\text{cN}\times\text{m}$ was used in the study as the spring element. It was calibrated in the range of 1-50 m with measurement error 0.01 $\text{cN}\times\text{m}$. Shear and tension tests were carried out with Vishay strain gauge's resistance TNA Huntleigh model 615. Resistive strain gauge transducers belong to the group of mechanical-electrical converters. They are capable of processing the instantaneous geometric strain on the variable value of the electric current due to the changes in material resistance. Crystal structure deformation of conductive material is the immediate cause of the change in resistance. Its life is determined by elastic hysteresis, delayed elastic, plastic material flow, fatigue, thermal stress and strain. The elastic element records relative increase in measurement of parameter R. It is expressed as a product of the relative changes in the coefficient of linear parameters and sensitivity deformation transformations.

The measurement system consisted of electromechanical linear drive equipped with a stepper motor company ISEL powered by IT 116g standard power supply and controlled by the utility PAL-PCV1, 5. The software was operated from the display box implemented in the environment, „Delphi Professional 7.0”. It enabled the adjustment of feed speed or blade clamps, automatic stop after receiving a signal from the strain gauge (broken bracket) and manual positioning of the blade or bracket after sample replacement.

Układ pomiarowy mierzący ugięcie elementu sprężystego składa się z czterech tensometrów połączonych w klasyczny układ mostka, którego zaletą jest duża wartość sygnału wyjściowego oraz skuteczna kompensacja termiczna. Tworzą go 4 tensometry TF-2/350 z materiału Constantan o parametrach $R=350,3 \Omega$, max. natężeniu prądu pomiarowego $I \leq 40 \text{ mA}$, odkształceniu max. $\leq 4\%$, współczynnika czułości odkształceniowej $k: 2,1 - 2,2$, tolerancji współczynnika $k=0,5\%$, wytrzymałości zmęczeniowej $n>107$ dla $\epsilon = 1\%$ oraz termicznym współczynnikiem zmiany rezystancji: $\alpha = 2 \times 10^{-5}/^\circ\text{K}$.

Jako element kondycjonujący sygnał z przetworników tensometrycznych zastosowano moduł VT 100, który umożliwia zasilanie tensometrów stabilizowanym napięciem 3 V lub 5 V oraz wzmacnianie sygnałów napięciowych, będących efektem konwersji geometrycznych odkształceń elementu reakcyjnego tensometru. System posiada wbudowany układ kompensacji temperatury oraz zerowania mostka tensometrycznego, obciążenie wyjścia układu powinno być $> 10 \text{ k}\Omega$ oraz 100 pF . Całość zasilana jest ze stabilizowanego zasilacza sieciowego 12 V/100 mA. Moduł ten, oprócz graficznego wyświetlacza posiada port USB 2.0, umożliwiającą akwizycję szczytowych wartości danych tensometrycznych pod postacią plików txt do modułu oprogramowania rejestrującego, gdzie prezentowane są liczbowo i graficznie.

Badaniom próbnym poddano następujące materiały łączące: Transbond XT 3M, Light Bond Reliance, Enlight Ormco.

Sporządzono 90 próbek z usuniętymi zębami przedtrzonowymi ludzkimi po uprzedniej dezynfekcji preparatem Incidin liquid z propanolem. Zęby po ekstrakcji przechowywane były w roztworze 0,9% NaCl w temperaturze 37°C do 2 tygodni. Następnie zostały umieszczone w sześciennych ramkach o wymiarach $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ ufiksowanych za pomocą żywicy poliestrowej Plus 710 firmy Novol (RYS. 1). Utworzono losowo 3 grupy po 10 próbek. Każda grupa została przypisana do odpowiedniej metody badawczej (skręcanie, ścinanie, rozciąganie) oraz do badanego kleju. Powierzchnia szkliva, do której bezpośrednio przylegała podstawa zamka była wolna od wypełnień, próchnicy i nie wykazywała odchyżeń od stanu prawidłowego, co oceniono przy użyciu mikroskopu cyfrowego z sensorem CMOS 2,0 Megapikseli z oprogramowaniem MicroCapture i interfejsem PC USB 2.0.

Po oczyszczeniu szkliva zębów pastą z pumeksem, wytrawiono je 37% kwasem ortofosforowym, przepłukano wodą i osuszono. Odtłuszczono spirytusem podstawę zamków, a następnie osuszono powierzchnię łączącą sprężonym powietrzem. Polimeryzację każdego z tworzyw i ich łącznie przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta. Do polimeryzacji użyto lampy polimeryzacyjnej z diodą monochromatyczną o mocy $1000 \text{ mW}/\text{cm}^2$ firmy Heraeus Kulzer, Translux Power Blue.

Do badań użyto zamków firmy RMO Integra 0.22'.

Badania przeprowadzono in vitro w temperaturze 24°C w godzinę po przytwierdzeniu zamka, a zatem pominięto wpływ warunków środowiska jamy ustnej na właściwości mechaniczne badanych polimerów. Dane przesyłano poprzez konwerter analogowo cyfrowy do komputera klasy PC, a wynik obrazowano w postaci wykresu z maksymalną wartością, przy której dochodziło do zerwania materiału. Urządzenie wyskalowane w Niutonach prowadziło pomiar z prędkością przesuwu $5 \text{ mm}/\text{min}$. Badanie maksymalnego momentu obrotowego przeprowadzono przy użyciu analogowego dynamometru japońskiej firmy Tohnichi FTD50CN2-S wykalibrowanego w $\text{cN}\times\text{m}$ w zakresie od 1-50, z błędem pomiarowym $0,01 \text{ cN}\times\text{m}$. Wykonano po 10 prób wytrzymałościowych dla skręcania, rozciągania i ścinania dla każdego kleju oraz metody pomiarowej.

The measurement system was designed for evaluation of deflection of elastic elements. It consists of four strain gauges connected in a conventionally designed bridge. The advantage of such connection is the large value of signal output and effective thermal compensation. It consists of four strain gauges TF-2/350 Constantan material with parameters $R = 350.3 \Omega$, max. Measuring a current $I \leq 40 \text{ mA}$, max strain. $\leq 4\%$, the sensitivity coefficient of deformation transformations $k: 2.1 - 2.2$, tolerance factor $k = 0.5\%$, the fatigue strength $n>107$ for $\epsilon = 1\%$, and the thermal coefficient of resistance changes: $\alpha = 2 \times 10^{-5}/^\circ\text{K}$.

Module 100 was used as a part of load cell conditioning signal which enabled the power supply to the strain gauges stabilized with 3V and 5V voltage as well as the voltage amplification. The system incorporates a built-in temperature compensation and resetting bridge strain gauge. Desired loading output of the system should exceed $10 \text{ k}\Omega$ and 100 pF . It is powered by stabilized power supply $12 \text{ V}/100 \text{ mA}$. In addition to a graphical display the module also contains an USB 2.0 port enabling peak load cell data acquisition in the form of txt file into recording software module which are presented numerically and graphically.

The following materials were tested in the study: 3M Transbond XT, Reliance Light Bond, Ormco Enlight.

90 samples of extracted human premolars were made which was preceded by disinfection with Incidin liquid formulation of propanol. The extracted teeth were stored in 0.9% NaCl solution at 37°C for 2 weeks. Then they were placed in cubic boxes ($2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) fixed with polyester resin NOVOL Plus 710 (FIG. 1). Three groups of 10 samples were randomly created. Each group was assigned to the particular experimental method (torsion, shear or stretch test) and to the adhesive test. Enamel surface adjacent to the bracket was free of fillings, tooth decay or any other abnormalities which was confirmed by digital microscope analysis with 2.0-megapixel CMOS sensor MicroCapture software and PC interface USB 2.0.

Tooth enamel was cleaned with pumice paste and etched with 37% phosphoric acid, rinsed with water and dried. The base of the brackets was degreased with alcohol and then the connective surface was dried with compressed air. The polymerization of each material and their combination was performed according to manufacturer's instructions. Polymerization was performed with curing lamp with LED monochromatic power Heraeus Kulzer $1000 \text{ mW}/\text{cm}^2$, Translux Power Blue.

Brackets RMO's Integra 0.22' were used in the study.

The experiment was conducted in vitro at 24°C one hour after bracket attachment and, therefore, we neglected the influence of oral environment on mechanical properties of investigated polymers. Data was transmitted via an analog digital converter to a PC. The result was visualized as a graph with the maximum value at which the material was broken. The device was calibrated in Newtons and the scrolling speed was established at $5 \text{ mm}/\text{min}$. Maximum torque assessment was performed with an analog dynamometer Japanese company Tohnichi FTD50CN2-S $\text{cN}\times\text{m}$ calibrated in the range of 1-50 m and the measurement error $0.01 \text{ cN}\times\text{m}$. Ten tests were performed for torsion strength, tension and shear for each adhesive and method of measurement.

Zgodność rozkładu badanych zmiennych z rozkładem normalnym zbadano przy pomocy testu Shapiro-Wilka.

Do porównania wyników testów wytrzymałościowych zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) wraz z testami post-hoc Tukey'a. Przy pomocy testów post-hoc Tukey'a oznaczono jednorodne grupy wyników. Znakami „xxxx” umieszczonymi w odpowiednich wierszach oznaczono jednorodne grupy średnich (są to te średnie, które nie różnią się istotnie pomiędzy sobą). Natomiast wszystkie średnie, nie oznaczone, należące do tej samej jednorodnej grupy, różnią się w sposób istotny przy $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki przedstawiono w tabelach i na wykresach dla maksymalnych naprężeń stycznych (średnich, maksymalnych i minimalnych) w testach na ścinanie, rozciąganie i skręcanie.

Dla próby ścinania najwyższe wartości średnich naprężeń granicznych wykazał Transbond XT. Najniższe wartości średnie ustalono dla Enlight Ormco. Wyniki przedstawiają TABELĘ 1 i 2.

Dla próby rozciągania najwyższe wartości średnich naprężeń granicznych wykazał Enlight Ormco. Najniższe wartości średnie ustalono dla Transbond XT 3M. Wyniki przedstawiają TABELĘ 3 i 4.

Compatibility of measured variables distribution with normal distribution was carried out with Shapiro-Wilk test.

To compare the results of stress tests we applied Univariate analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey tests. Homogeneous groups of results were established with post-hoc Tukey tests. Homogenous groups of mean values, with no significant variation within each group, were marked with “xxxx” in corresponding lines. All non-marked mean values belonging to the same homogeneous group differed significantly ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The results are presented in tables and graphs for the maximum shear stress (average, maximum and minimum) in tests of shear, tension and torsion.

The maximal and minimal values of average shear stress were demonstrated respectively with Transbond XT and Ormco Enlight. The results are presented in TABLES 1 and 2.

Tension stress showed maximal mean values for Ormco Enlight and minimal mean values for 3M Transbond XT. The results are shown in TABLES 3 and 4.

TABELA 1. Wyniki pomiarów sił zrywających w testach ścinania.
TABLE 1. Results of breaking strength measurement in shear tests.

Klej Bond	Liczba Number	Średnia Mean	SD	min	max
Light Bond Reliance	10	5.97	1.83	3.58	8.25
Enlight ORMCO	10	5.64	2.20	2.57	9.50
Transbond XT 3M	10	9.31	2.86	5.94	15.62

TABELA 2. Testy post-hoc Tukey'a obliczone dla odpowiednich par dla sił zrywających w testach ścinania.
TABLE 2. Post-hoc Tukey test for the corresponding pairs of breaking strength in shear tests.

	Transbond XT 3M	Light Bond Reliance
Enlight ORMCO	0.0004	0.7460

TABELA 3. Wyniki pomiarów sił zrywających w testach rozciągania.
TABLE 3. Results of the breaking strength measurements in tension tests.

Klej Bond	Liczba Number	Średnia Mean	SD	min	max
Light Bond Reliance	10	3.25	0.77	2.20	4.44
Enlight ORMCO	10	3.52	0.96	2.54	5.05
Transbond XT 3M	10	3.20	1.48	1.84	7.27

TABELA 4. Testy post-hoc Tukey'a, obliczone dla odpowiednich par dla sił zrywających w testach rozciągania.
TABLE 4. Post-hoc Tukey tests for corresponding pairs of breaking strength in tension tests.

	Transbond XT 3M	Light Bond Reliance
Enlight ORMCO	0.5588	0.6240

Najwyższe średnie wartości dla momentu skręcającego przy którym doszło do zerwania materiału zarejestrowano dla Light Bond Reliance. Najniższe wartości średnie wykazał Enlight ORMCO. Wyniki przedstawiają TABELĘ 5 i 6.

The maximal mean values of torsion moment, at which material rupture occurred, were recorded for Reliance Light Bond. The minimal mean value was determined for Ormco Enlight. The results are shown in TABLES 5 and 6.

TABELA 5. Wyniki pomiarów sił zrywających w testach skręcania.
TABLE 5. Results of breaking strength measurements in torsion tests.

Klej Bond	Liczba Number	Średnia Mean	max	SD	min
Light Bond Reliance	10	3.3	4.36	0.95	2.35
Enlight ORMCO	10	2.73	3.46	1.12	2.06
Transbond XT 3M	10	3.17	3.8	1.39	2.37

TABELA 6. Testy post-hoc Tukey'a obliczone dla odpowiednich par dla sił zrywających w testach skręcania.
TABLE 6. Post-hoc Tukey's tests for corresponding pairs of breaking strength in torsion tests.

	Enlight ORMCO	Transbond XT 3M
Light Bond Reliance	0.6240	0.9246

Właściwości wytrzymałościowe każdego materiału są jego reakcją na obciążenie zewnętrzne. Napężenie odnosi się do stanu wewnętrznego badanego materiału, definiuje się je jako stosunek siły $F(N)$ do jednostki powierzchni (m^2). Przy stosowaniu nacisku zewnętrznego możemy obliczyć wewnętrzne napężenie (maksymalne graniczne) na podstawie analizy siły (F) biorąc pod uwagę pole powierzchni podstawy zamka, na które działa siła. Obserwując metodykę badań oraz stosowaną aparaturę dochodzimy do wniosku, że uzyskiwane na przestrzeni lat wyniki pomiarów są nie tylko różne, lecz często ze sobą nieporównywalne [6]. Połączenie metalowego zamka ze szkliwem na powierzchni zęba za pomocą biomateriału (kleju), wykazującego cechy dwustronnej adhezji prowadzi do powstania zespolenia kompozytowego, wykazującego zróżnicowaną wytrzymałość mechaniczną, zależną od kierunku działania siły, indywidualnych cech fizykochemicznych szkliwa, cech powierzchni zamka oraz własności adhezyjnych spoiny. Według Cagri użycie światła halogenowego powoduje wzrost siły wiązania kleju średnio (8,35 MPa) niż LED (5,832 MPa) [7].

Do przyklejania zamków aktualnie używa się najczęściej żywicy akrylanowych z wypełniaczem (formuła Bis GMA). Dostępne są one w wielu odmianach różniących się głównie składem i ilością wewnętrznego wypełniacza oraz sposobem inicjowania polimeryzacji żywicy, czyli utwardzanie chemiczne lub światłem [8]. Siła wiązania kleju pomiędzy aparatem i szkliwem zależy od wytrawiacza, jego konsystencji i składu procentowego, czasu wytrawiania, wystarczającej polimeryzacji kleju, odległości między źródłem światła i zębami, ukształtowaniem podstawy zamka oraz użytego do jego budowy materiału, środowiska jamy ustnej, i wprawy klinicysty [9]. W praktyce klinicznej napężenia powstające podczas zdejmowania zamków są składową skręcania, rozciągania i ścinania [10]. Użycie właściwego kleju skraca czas wizyty, co w rezultacie zmniejsza dyskomfort pacjenta i eliminuje ryzyko próchnicy po utracie elementów aparatu [11]. Zaznaczyć należy, by dokonując oceny wytrzymałości klejów skupiać się przede wszystkim na analizie porównawczej otrzymanych poszczególną metodą badawczą wyników a w następnej kolejności ocenić bezwzględne wartości otrzymanych wyników.

Strength properties of each material are related to the external load. Stress refers to the material internal state and is defined as the ratio of the force F (N) per unit area (m^2). While external pressure application the internal stress (maximum limit) can be calculated from force (F) acting on the surface area of the buckle base. Previous studies, carried out with different methodology and equipment, showed discrepant and incomparable results [6]. Anastomosis of a metal buckle with enamel on the tooth surface by biomaterial (bond), presenting bilateral adhesion properties, results in fusion of the composite. It exhibits diverse mechanical strength depending on the force direction, individual physical and chemical characteristics of the enamel, buckle surface and adhesive properties of the weld. According to Cagri, application of halogen light augments the adhesive binding strength compared to LED, on average (8.35 MPa) and (5.832 MPa) respectively [7].

Nowadays acrylic resins with a filler (formula Bis GMA) are the most common materials used for bracket fixation. They are available in many varieties that differ mainly in composition and quantity of the internal filler and polymerization method of the resin - chemical or curing with light [8]. The strength of the adhesive bond between the orthodontic bracket and enamel depends on the following factors: etchant, its consistency and the composite percentage, etching time, sufficient polymerization of the adhesive, the distance between the light source and teeth, buckle and the shaping of the base used in its construction material, oral environment and the clinician skills [9]. In clinical practice the strain generated during the removal of brackets is the component of torsion, tension and shear [10]. By using the proper adhesive, the time of the procedure and subsequently patient discomfort could be reduced. It also eliminates the risk of decay after the loss of system elements [11]. It should be emphasized that in the assessment of adhesive strength, comparative analysis of the results obtained in particular research method in the first place and secondly evaluation of the absolute values of the results should be taken into account.

Podobnie jak u R. Valetta i D. Prisco [10] wykazano wyższe wartości znamienne statystycznie podczas testów wytrzymałościowych na zrywanie, skręcanie i rozciąganie dla Transbond XT. Ukształtowanie powierzchni podstawy zamków ewoluowało do takiego poziomu, że wyniki badań przeprowadzone na różnych zamkach są ze sobą nieporównywalne [12]. Inną przyczyną stwierdzoną przez Wendla i Droschla w różnicach pomiarowych jest to, że siła wiązania przyklejonych zamków wzrasta podczas pierwszych 24 godzin [13]. Średnie wartości uzyskane podczas ścinania, rozciągania oraz skręcania gwarantują utrzymanie zamków na zębach podczas leczenia, a polimeryzacja przy użyciu lampy polimeryzacyjnej zmniejsza ryzyko popełnienia błędu podczas przyklejania zamków.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wytrzymałościowych w testach na ścinanie, rozciąganie i skręcanie stwierdzono:

1. Wyniki testów tensometrycznych wykazywały w badanych materiałach zbieżny trend największej odporności na działanie sił skręcających, mniejszy na działanie sił ścinających i najmniejszy na wpływ sił rozciągających.

2. W testach porównawczych wykazano, iż wyniki uzyskane przy pomocy skonstruowanych urządzeń były zbieżne z dotychczas istniejącymi danymi.

3. Rozbicie wypadkowej na poszczególne składowe naprężenia odzwierciedla naturalne zachowania wytrzymałościowe materiału łączącego z zamkami ortodontycznymi.

Podziękowania

Dziękuję wszystkim, którzy pomogli w przygotowaniu materiału do tej pracy i powstania artykułu. Badania finansowane ze środków własnych.

The results of our study demonstrated statistically significant higher values of stress tests to torsion, shear and tension for Transbond XT and they are comparable with the results of Prisco and Valetta [10]. The structure of the bracket base has evolved over time to such level that it is almost impossible to compare the results of various studies [12]. Another factor contributing to the results discrepancies is the fact that the bracket binding strength increases within first 24 hours since application [13]. The mean values obtained during torsion, shear and tension guarantee the maintenance of brackets on the teeth during treatment. The polymerization with a polymerization lamp reduces the risk of error while brackets fixation.

Conclusions

1. The results of the material strain gauge study showed the greatest resistance convergent trend for torsion forces, less significant trend for shear forces and the least influence of tension forces.

2. In comparative tests we showed that the results obtained with the constructed prototype system are compatible with existing data.

3. Components of the net force reflect the natural behavior of the orthodontic adhesives.

Acknowledgements

Special thanks to all who helped in preparing the material for this work and the creation of the article. Study financed from own resources.

Piśmiennictwo

- [1] Newman G. V.: Adhesion and orthodontic plastic attachments. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 56 (1969) 573-588.
- [2] Reynolds I. R., von Fraunhofer J. A.: Direct Bonding of Orthodontic Attachments to Teeth: the Relation of Adhesive Bond Strength to Gauze Mesh Size. Br. J. Orthod. 3 (1976) 91-95.
- [3] Kao E. C., Eliades T., Rezvan E., Johnston W. M.: Torsional bond strength and failure pattern of ceramic brackets bonded to composite resin laminate veneers. Eur. J. Orthod. 17 (1995) 533-540.
- [4] Relief, D. H.: Failure AT the dental adhesive etched enamel interface: J. Oral Rehab. 1 (1974) 265-284.
- [5] Bishara, S.E., Fehr, D.: Comparisons of the effectiveness of pliers with narrow and wide blades in debonding ceramic brackets. Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. 103 (1993) 253-257.
- [6] Prietsch J. R., Zpuhr A.M.: Development of a device to measure bracket debonding force In vivo. Eur. J. Orthodont. 29 (2007) 564-570.
- [7] Cagri U., Ozgur I.: Temperature rise and shear Bond strength of bondable buccal tubes bonded by various light sources. Eur. J. Orthod. 30 (2000) 413-417.

References

- [8] Proffit W. R., Fields H. W.: Ortodoncja współczesna. Czelej Publishing House 2001.
- [9] Bishara S. E., Ostby A. W., Laffoon J. F., Warren J.: Shear Bond Strength, Bond comparison of two adhesive systems following thermocycling. A New self-etch primer and a resin-modified glass ionomer. Angle Orthod. 77 (2007) 337-341.
- [10] Valletta R., Prisco D., Ambrosio L.: Evaluation of the debonding strength of orthodontic brackets using three different bonding systems. Eur. J. Orthod. 29 (2007) 571-577.
- [11] Graber T. M., Vanarsdall Jr. R. L.: Orthodontics, current principles and techniques. 3rd ed. Mosby Inc., St Louis 2000.
- [12] Smith D. C., Majjer R.: Improvements In bracket base design. Am. J. Orthod. 83 (1983) 227-281.
- [13] Wendl B., Droschl H.: A comparative in vitro study of the strength of directly bonded brackets using different curing techniques. Eur. J. Orthod. 26 (2004) 535-544.

OCENA WPŁYWU SIMWASTATYNY NA DEGRADACJĘ TERPOLIMERU Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU

ANNA JAROS^{1*}, BOŻENA JARZĄBEK², KAMILA ROWIŃSKA¹,
JANUSZ KASPERCZYK^{1,2}, HENRYK JANECEK², ANNA SMOLA²

¹ ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY
LABORATORYJNEJ W SOSNOWCU,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC

² CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE

* E-MAIL: DYLANKA@WP.PL

Streszczenie

Zbadany został wpływ simwastatyny na degradację terpolimerów LL-laktydu, glikolidu i węglanu trimetyleny z pamięcią kształtu. Badano mechanizm degradacji *in vitro*, w izotonicznym roztworze chloru sodu buforowanym fosforanami (PBS), matryc polimerowych wykonanych z dwóch materiałów z różną zawartością leku i bez simwastatyny. Polimery charakteryzowano przy użyciu: różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) (właściwości termiczne), chromatografii żelowej (GPC) (masy cząsteczkowe) i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) (skład i mikrostruktura). Profil uwalniania leku oceniano metodą spektroskopii UV-Vis.

Oceniono przydatność badanych materiałów do zastosowania w produkcji biokompatybilnych polimerowych resorbowlanych chirurgicznych systemów z pamięcią kształtu z własnością kontrolowanego uwalniania leku. Nie odnotowano istotnego wpływu 1% zawartości leku na przebieg degradacji.

Słowa kluczowe: terpolimery, degradacja, *in vitro*, simwastatyna, pamięć kształtu

[Inżynieria Biomateriałów 115 (2012) 45-51]

Wprowadzenie

W ostatnich latach, silnie wzrastała rola alifatycznych poliestrów w zastosowaniach do celów medycznych. Na rynku komercyjnym pojawiły się resorbowlane szwy, klipsy chirurgiczne, zszywki chirurgiczne, płytki kostne, skafoldy (ang. scaffolds) do inżynierii tkankowej, mikrosystemy kontrolowanego uwalniania leku. Pierwsze zastosowania tych materiałów zostały głównie uwarunkowane przez zdolność degradacji w organizmie ludzkim do praktycznie nietoksycznych produktów. Dzięki temu wyeliminowana została konieczność dodatkowego zabiegu chirurgicznego celem usunięcia implantu, co miało miejsce w wypadku stosowania implantów metalicznych. Jako pierwsze do celów medycznych stosowane były liniowe poliestry poli-L-laktydu i poliglikolidu [1-8]. Następnie poszukiwano nowych wielofunkcyjnych materiałów, odpowiednich do produkcji implantowanych wyrobów medycznych lub też nowoczesnych postaci kontrolowanego uwalniania leków. W reakcji kopolimeryzacji już na etapie syntezy, poprzez dobór odpowiednich komonomerów i warunków reakcji, można wpływać na mikrostrukturę łańcucha polimerowego i otrzymywać wielofunkcyjne materiały o różnych właściwościach fizycznych (przepuszczalność, wytrzymałość mechaniczna), kinetyce i mechanizmie degradacji [3-8].

THE INFLUENCE OF SIMVASTATIN ON TERPOLYMER DEGRADATION WITH SHAPE MEMORY PROPERTIES

ANNA JAROS^{1*}, BOŻENA JARZĄBEK², KAMILA ROWIŃSKA¹,
JANUSZ KASPERCZYK^{1,2}, HENRYK JANECEK², ANNA SMOLA²

¹ MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,
THE SCHOOL OF PHARMACY AND DIVISION
OF LABORATORY MEDICINE IN SOSNOWIEC,
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

² CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: DYLANKA@WP.PL

Abstract

The influence of simvastatin on degradation of terpolymers synthesized from L-lactide, glycolide, and trimethylene carbonate has been analyzed. The *in vitro* degradation of the matrices, obtained from two terpolymers with various chain structure and amount of simvastatin, was carried out in phosphate buffered solution. The terpolymers were characterized by using differential scanning calorimetry (DSC) (thermal properties), gel permeation chromatography GPC (molecular weights) and nuclear magnetic resonance (NMR) (composition and microstructure). Release profile of simvastatin was analyzed by means of UV-Vis spectroscopy. It was determined that the tested materials are useful for development of biocompatible resorbable surgical systems with the shape memory effect and controlled drug-release capability. There was no significant difference in the degradation process between the matrices without drug and with 1% of simvastatin.

Keywords: terpolymers, degradation, *in vitro*, simvastatin, shape memory

[Engineering of Biomaterials 115 (2012) 45-51]

Introduction

The role of aliphatic polyesters in medical application significantly increased over the recent years. Resorbable sutures, surgical clips and staples, bone plates, tissue engineering scaffolds, controlled drug delivery systems have entered the market. The first application of these materials was encouraged by their biodegradability in the human body to practically non-toxic products. This eliminates the necessity of implant removal and additional surgery, which is needed in the case of the metallic implants. At the beginning, linear polyesters of poly-L-lactide and poly-glycolide were mainly used for the medical purposes [1-8]. Then, new multifunctional materials, for implantable medical devices and modern controlled drug delivery systems, were searched.

Copolymerization can be applied to obtain the multifunctional polymers with specially tailored physical properties (permeability, mechanical strength), kinetics and mechanism of degradation, mainly by selecting of appropriate comonomer units and adjusting polymer chain distribution (microstructure) [3-8].

Dobrym przykładem materiału wielofunkcyjnego jest coraz częściej opisywana grupa terpolimerów LL-laktidu, glikolidu i węglanu trimetyleny otrzymana przy użyciu acetyloacetonienu cyrkonu jako inicjatora. Materiały te, oprócz dobrych właściwości mechanicznych, biokompatybilności, zdolności do degradacji w organizmach żywych, wykazują nowo odkrytą bardzo interesującą właściwość: efekt pamięci kształtu [1-3]. Boddźcem wyzwalamym zmianę kształtu tymczasowego do trwałego, w przypadku tych terpolimerów jest temperatura. Powrót do kształtu trwałego z tymczasowego następuje po podgrzaniu materiału powyżej temperatury T_g , która powinna być zbliżona do temperatury ciała ludzkiego [5,9-11].

Simvastatyna to lek należący do statyn, których podstawową funkcją jest inhibicja reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (HMG-CoA), na skutek czego hamują produkcję endogennego cholesterolu. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszy się pozalipidowe działanie statyn, m.in. właściwości immunosupresyjne, neuroprotektoryjne, zwiększające osteogenezę kości, hamowanie proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyń [12-14].

Niniejsza praca jest próbą nadania dwóm terpolimerom z tej grupy materiałów kolejnej cechy - zdolności do kontrolowanego uwalniania leku simvastatyny. Badania w tym kierunku mają na celu opracowanie nowych materiałów biomedycznych z pamięcią kształtu do celów krótkoterminowej małoinwazyjnej chirurgii, będących jednocześnie systemem miejscowego kontrolowanego uwalniania leku. Materiał taki, ze względu na szeroki zakres potencjalnego działania farmakologicznego, stworzyłby nowe możliwości terapii wielu schorzeń [14].

Materiały i metody

Matryce zawierające lek simvastatynę wykonano z 2 różnych materiałów terpolimerowych zsyntetyzowanych przy użyciu acetyloacetonienu cyrkonu (IV) - $Zr(Acac)_4$ jako inicjatora w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze. Polimery zsyntetyzowano według metody opisanej w literaturze [10]. TER1 to terpolimer laktid/glikolid/TMC o udziale molowym odpowiednio 74/15/11, TER2 - terpolimer laktid/glikolid/TMC 67/10/23 zawierający w swej strukturze długie bloki węglanowe. W syntezie TER2 zamiast cyklicznego TMC zastosowano jego wcześniej zsyntetyzowany liniowy oligomer o masie cząsteczkowej 5000 Da, którego łańcuch na końcach zawierał grupy hydroksylowe. Materiały charakteryzowały się podobnymi masami molowymi, różniły się mikrostrukturą łańcuchów polimerowych. Wykonano matryce bez leku oraz o 0,1% i 1% zawartości simvastatyny (Polpharma) zgodnie z następującą procedurą. Odważono na szalce szklanej 1 g polimeru i rozpuszczono poprzez dodanie 4 ml chlorku metylenu, następnie zmieszano dokładnie z roztworem simvastatyny w chlorku metylenu o odpowiednim stężeniu. Tak przygotowane matryce suszono w temperaturze pokojowej, a następnie w warunkach próżniowych celem usunięcia rozpuszczalnika. Z otrzymanych krążków polimerowych z lekiem i bez leku wycinano matryce polimerowe o średnicy 10 mm. Matryce ważono przed degradacją (W_0), następnie umieszczano je w szczelnie zamykanych fiolkach wypełnionych odpowiednią ilością PBS (pH 7,4) (1 ml PBS/15 mg polimeru). Buteleczki umieszczono w temp. 37°C, w warunkach stałego wytrząsania. W regularnych odstępach czasu wymieniano bufor fosforanowy i badano stężenie leku, w każdym punkcie pomiaru na podstawie trzech prób ($n=3$). Stężenie uwolnionego leku oznaczano metodą spektroskopii UV-Vis.

A good example of multifunctional material is frequently reported terpolymer of L-lactide, glycolide, and trimethylene carbonate obtained with the use of zirconium (IV) acetylacetonate, as an initiator. These materials, in addition to the good mechanical properties, biocompatibility, ability to degrade in living organisms, exhibit also newly discovered very interesting property: the shape memory effect [1-3]. The terpolymers are stimulated by temperature to recover their permanent shape from temporary shape. The permanent shape recovery occurs after heating the material above the T_g , which should be close to human body temperature [5,9-11].

Simvastatin is a drug that belongs to statins, which inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA), and this results in reduction of endogenous cholesterol production. Nowadays, their pleiotropic effects such as: immunosuppression, brain neuroprotection, influence on osteogenesis, inhibition of proliferation of vascular wall smooth muscles cells enjoy a great interest [12-14].

This work is an effort into giving new feature of two L-lactide, glycolide, and trimethylene carbonate terpolymers: ability of controlled simvastatin release. This approach will give the possibility of developing new biomedical materials with the shape memory effect and simultaneously, the ability of controlled drug delivery used for short-term minimally invasive surgery. The wide range of pharmacological activity of this material could create new possibilities for therapy of many diseases [14].

Materials and methods

Matrices that contain simvastatin (Polpharma) were prepared from two different terpolymers, synthesized by ring opening polymerization with zirconium (IV) acetylacetonate - $Zr(Acac)_4$ as an initiator, at the Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences in Zabrze. Polymers were synthesized according to the method described in the literature [10]. TER1 and TER2 materials had similar molecular weights (TER1 34 kDa, 36 kDa TER2), but differed in polymer chains microstructure. TER1 was lactide/glycolide/TMC with molar ratio 74/15/11. TER2 with the initial molar ratio of lactide to glycolide to TMC: 67/10/23 contained in its chains long carbonate blocks. During the synthesis of TER2, the previously synthesized TMC oligomer (5000 Da) terminated by hydroxyl group was used, instead of cyclic TMC. Drug free matrices and matrices containing 0.1% as well as 1% of the drug were prepared according to the following procedure. The 1 g of polymer was dissolved in 4 ml of methylene chloride, then mixed thoroughly with the methylene chloride solution of simvastatin (0.1% or 1%). The matrices were evaporated at ambient temperature and dried under reduced pressure until complete solvent evaporation. From the received drug free and simvastatin containing polymeric matrices, the discs of 10 mm diameter were cut out. Matrices were weighed before degradation (W_0). They were placed in flasks filled with the appropriate amount of PBS (pH 7.4) (1 ml of PBS/15 mg polymer) and incubated at 37°C under constant agitation. At regular intervals the phosphate buffered saline solution was renewed and the drug concentration was determined by means of UV-Vis spectroscopy (double-beam spectrophotometer JASCO V-570, UV-Vis- NIR with special quartz micro-cells) within the wave-length range 260-220 nm. Before analysis, the PBS solution containing simvastatin was mixed 1:1 (v/v) with acetonitrile (purity $\geq 99\%$) and stirred. Then, the drug concentration was calculated on the basis of the value of absorbance maximum at 238 nm.

Pomiary wykonano w zakresie długości fali 220-260 nm wykorzystując dwuwiązkowy spektrofotometr JASCO V-570, UV-Vis NIR. Do roztworu zawierającego uwolnioną simvastatynę dodawano acetonitryl w ilości: 1:1 (v/v) i dokładnie mieszano przez wytrząsanie. W tak przygotowanych próbkach, wyznaczano stężenie leku na podstawie wartości absorpcji zmierzonej w maksimum przy długości fali 238 nm.

Po określonym czasie, z eksperymentu wyłączano jedną z próbek w celu zbadania procesu degradacji matrycy polimerowej. W_{wet} („masę mokrą”) oznaczano poprzez zważenie mokrych matryc po degradacji. Po procesie suszenia w próżni 80 hPa przez 72 h matryce ponownie ważono używając „masę suchą” po degradacji W_{dry} . Chłonność wody oraz ubytek masy matryc polimerowych podczas degradacji wyznaczano na podstawie następujących wzorów:

$$\text{Chłonność wody [\%]} = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100\% \text{ [\% wag.]}$$

$$\text{Ubytek masy [\%]} = \frac{W_0 - W_{dry}}{W_0} \times 100\% \text{ [\% wag.]}$$

Matryce po degradacji analizowano za pomocą GPC, NMR, DSC. Skład i budowę łańcuchów badanych polimerów wyznaczano na podstawie widm NMR, otrzymanych przy użyciu spektrometru magnetycznego rezonansu jądrowego o wysokiej rozdzielczości (600 MHz BRUKER Ultrashield Avance II) w roztworze deuterowanego chloroformu w temperaturze pokojowej, stosując tetrametylosilan (TMS) jako standard wewnętrzny. Analizę otrzymanych widm NMR przeprowadzono na podstawie metody opisanej w literaturze [5]. Średnią liczbową masę cząsteczkową (M_n), wagowo średnią masę cząsteczkową (M_w) oraz rozrzut mas cząsteczkowych (D) próbek oznaczono przy pomocy chromatografii żelowej (GPC) (Physics SP 8800 kolumny: Viscotek 3580, temp 35°C, faza ruchoma: chloroform o przepływie równym 1 ml/min, detektor refrakcyjny). Analizę termiczną materiałów przeprowadzono z użyciem kalorymetru różnicowego DSC 2010 (TA Instruments, New Castle, DE).

Wyniki i dyskusja

Na podstawie badania NMR stwierdzono, że wybrane materiały TER1 i TER2, mimo podobnych średnich mas molowych (TER1 34 kDa, TER2 36 kDa) i małych różnicach w udziale procentowym komonomerów, różniły się mikrostrukturą łańcuchów polimerowych (TABELA 1). TER1 posiadał w swej strukturze głównie sekwencje mieszane i krótkie bloki laktydylowe. Semikrystaliczny TER2 odznaczał się zawartością długich bloków laktydylowych i węglanowych. Długie bloki węglanowe obserwowane w TER2 są skutkiem zastosowania oligo-TMC w procesie syntezy. Natomiast długie mikrobloki laktydylowe odpowiadają za wytworzenie fazy krystalicznej w tym polimerze.

Otrzymane matryce polimerowe z lekiem i bez leku poddano analizie właściwości termicznych przy użyciu DSC (TABELA 2). Dodatek simvastatyny obniżał o kilka stopni temperaturę T_m i T_g badanych terpolimerów. Efekt ten jest zgodny z opublikowanymi danymi, sugerującymi, że obecność plastyfikatorów, którymi mogą być również leki, powoduje obniżenie temperatury zeszklenia matrycy polimerowej [15].

After the predefined period of time, one of the samples was excluded from the experiment in order to examine the process of the polymer degradation. Wet matrices were weighed to obtain mass after degradation (W_{wet}). Then, they were placed in a vacuum at 80 hPa for 72 h, dried and weighed again to obtain W_{dry} mass after degradation. Dry matrices after degradation were analyzed by means of GPC, NMR and DSC.

The water uptake and weight loss were estimated according to the following equations:

$$\text{Water uptake [\%]} = \frac{W_{wet} - W_{dry}}{W_{dry}} \times 100\% \text{ [wt\%]}$$

$$\text{Weight loss [\%]} = \frac{W_0 - W_{dry}}{W_0} \times 100\% \text{ [wt\%]}$$

Composition and structure of polymer chains were investigated on the basis of NMR spectra recorded on high-resolution 600 MHz BRUKER Avance Ultrashield II spectrometer, at room temperature, using TMS as internal standard. $CDCl_3$ was used as a solvent. Analysis of the obtained NMR spectra was carried out through the procedures described in the previous publication [5]. The number average molecular weight (M_n), the weight-average molecular weight (M_w) and molecular mass dispersion (D) were determined by means of GPC chromatography (GPC Viscotek Rimax, column: Viscotek 3580, temp 350°C, mobile phase: chloroform equal flow to 1 ml/min, refractive index detector). Thermal analysis was made using differential scanning calorimeter DSC 2010 (TA Instruments).

Results and discussion

It was determined that the selected TER1 and TER2 materials had similar molecular weights (TER1 34 kDa, TER2 36 kDa), and percentage of comonomeric units contribution, but differed in polymer chains microstructure (TABLE 1). TER1 was composed mainly of random sequences and short lactidyl blocks. Semi-crystalline TER 2 was distinguished by long lactidyl and trimethylenecarbonate blocks contribution. Long carbonate blocks observed in TER2 are the result of applying oligo-TMC in the synthesis, whereas lactidyl microblocks are responsible for crystalline phase creation. Thermal properties of the obtained polymer matrices with drug and without drug were analyzed by using a DSC (TABLE 2). Addition of simvastatin to the polymer matrix reduced slightly the T_m and T_g of tested terpolymers. This is consistent with the published data, which suggest that the presence of plasticizers including the drug will tend to lower polymer glass transition temperature [15].

TABELA 1. Charakterystyka mikrostruktury terpolimerów otrzymanych matryc polimerowych bez leku, przed procesem degradacji.

TABLE 1. Characteristic of the terpolymer microstructure of tested matrices without drug before degradation process.

	^a F_{LL}	^a F_{GG}	^a F_{TMC}	f_{LL}	^a f_{GG}	^a f_{TMC}
matryca TER1 / matrix TER1	74	15	11	3.32	1.13	1.48
matryca TER2 / matrix TER2	67	10	23 (O-TMC)	7.01	1.20	14.71

^awyniki otrzymane na podstawie NMR: F_{LL} - molowy udział jednostek laktydylowych, F_{GG} - molowy udział jednostek glikolidylowych, F_{TMC} - molowy udział jednostek węglanowych, f_{LL} - średnia długość bloków laktydylowych, f_{GG} - średnia długość bloków glikolidylowych, f_{TMC} - średnia długość bloków węglanowych

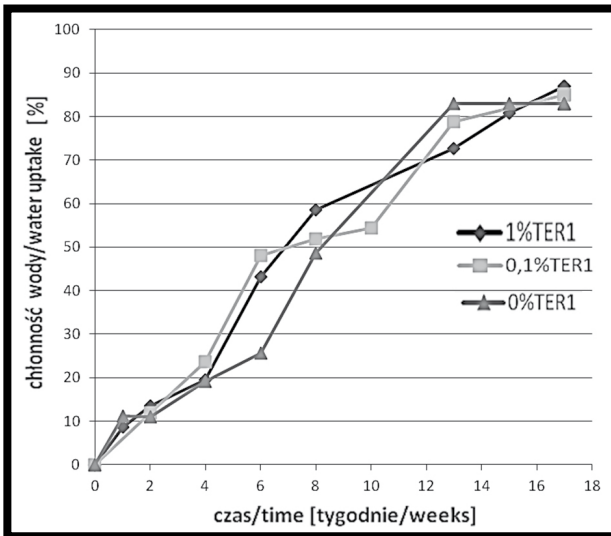
^a results obtained from NMR: F_{LL} - molar lactidyl unit contribution, F_{GG} - molar glycolidyl unit contribution, F_{TMC} - molar carbonate unit contribution, f_{LL} - lactidyl average block lengths, f_{GG} - glycolidyl average block lengths, f_{TMC} - carbonate average block lengths

TABELA 2. Właściwości termiczne otrzymanych matryc polimerowych bez leku i z określoną zawartością simwastatyny, przed procesem degradacji.
TABLE 2. Thermal properties of matrices before degradation process with and without simvastatin.

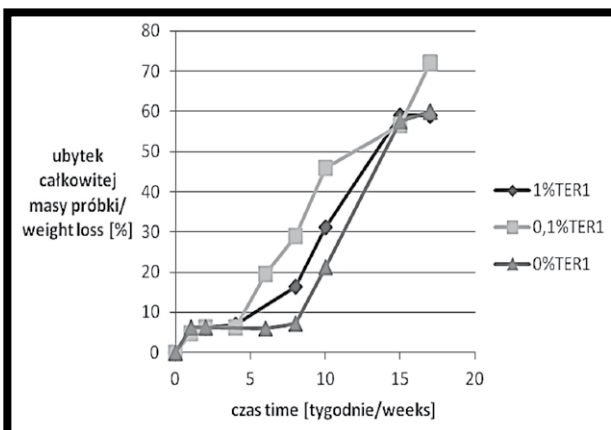
Rodzaj matrycy Type of matrices	^b T _m [°C]	^b ΔH _m [J/g]	^b T _g [°C]
matryca TER1 0% simwastatyny matrix TER1 0% of simvastatin	76	15	47
matryca TER1 1% simwastatyny matrix TER1 1% of simvastatin	71	22	46
matryca TER2 0% simwastatyny matrix TER2 0% of simvastatin	84	33	41
matryca TER2 1% simwastatyny matrix TER2 1% of simvastatin	77	21	40

^b na podstawie DSC

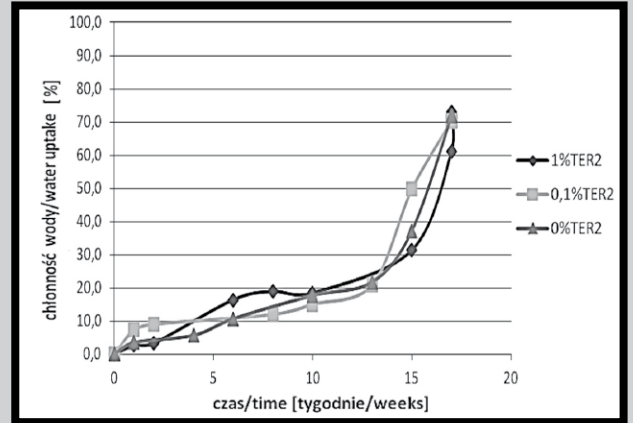
^b based on DSC



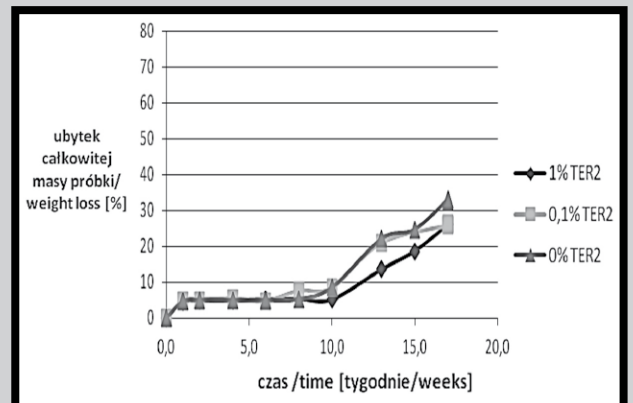
RYS. 1. Chłonność wody matryc otrzymanych z TER1 w procesie degradacji.
FIG.1. Water uptake during degradation of matrices obtained from TER1.



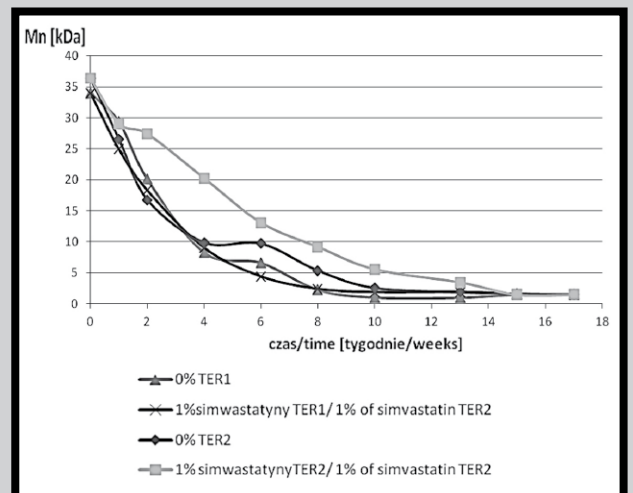
RYS. 2. Ubytek całkowitej masy matryc otrzymanych z TER1 w procesie degradacji.
FIG. 2. Weight loss during degradation of matrices obtained from TER1.



RYS. 3. Chłonność wody matryc otrzymanych z TER2 w procesie degradacji.
FIG.3. Water uptake during degradation of matrices obtained from TER2.



RYS. 4. Ubytek całkowitej masy matryc otrzymanych z TER2 w procesie degradacji.
FIG. 4. Weight loss during degradation of matrices obtained from TER2.



RYS. 5. Spadek liczbowo średnich mas molowych (Mn) dla matryc TER1 i TER2 o 1% zawartości simwastatyny i bez leku.
FIG. 5. The lost of Mn of matrices obtained from TER1 and TER2 with 1% of simvastatin, and drug free matrices.

Proces degradacji TER1 zachodził szybciej niż TER2. Chłonność wody TER1 wzrastała gwałtownie osiągając prawie 90% w 17 tygodniu degradacji (RYS. 1). Ubytek całkowitej masy próbki wynosił ponad 60% w 17 tygodniu degradacji (RYS. 2). Nie zaobserwowano istotnych, powtarzalnych różnic pomiędzy próbkami TER1 zawierającymi 1%, 0,1% i 0% leku. W przebiegu procesu degradacji TER2 chłonność wody wzrastała stopniowo do 13 tygodnia degradacji osiągając około 20%, następnie wzrastała gwałtownie osiągając 70% w 17 tygodniu degradacji (RYS. 3). Ubytek całkowitej masy próbki nie przekraczał 5% do końca 7 tygodnia degradacji. Po tym okresie masa zaczęła obniżyć się do niespełna 30% w 17 tygodniu degradacji (RYS. 4). Do 10 tygodnia degradacji nie zaobserwowano również istotnych, powtarzalnych różnic pomiędzy próbkami TER2 zawierającymi 1%, 0,1% i 0% leku. Od 10 do 15 tygodnia degradacji ubytek całkowitej masy próbki zachodził nieznacznie wolniej w przypadku matrycy TER2 z 1%-zawartością simwastatyny. Średnia masa molowa (RYS. 5) ulegała obniżeniu najszybciej dla TER1. Nie odnotowano istotnej różnicy pomiędzy szybkością ubytku masy molowej dla matrycy TER1 zawierającej lek oraz matrycy bez leku. Najwolniejszy spadek liczbowo średnich mas molowych zaobserwowano w przypadku matrycy TER2 z 1%-zawartością leku. Matryce TER2 bez leku charakteryzowały się spadkiem średnich mas molowych podobnym do TER1.

The process of TER1 degradation proceeded faster than TER2. The water uptake of TER1 increased and reached nearly 90% at the 17th week of degradation (FIG. 1). The loss of the total weight of the sample in the 17th week of degradation achieved over 60% (FIG. 2). Any significant differences between samples TER1 containing 1%, 0.1% and 0% of the drug have been observed. During degradation of TER2, water uptake increased gradually until 13 weeks to about 20%, then increased rapidly reaching 70% at 17th week of degradation (FIG. 3). The loss of the total weight of the samples did not exceed 5% during the first 7 weeks of degradation. After this period, the mass began to decrease, reaching about 30% loss at 17 week of degradation (FIG. 4). There have not been any significant differences between samples TER2 containing 1%, 0.1% and 0% of the drug until 10 weeks. From 10th to 15th week of degradation, the total weight loss of the sample was slightly slower for the TER2 with 1% simvastatin. Molecular weights (FIG. 5) decreased faster for TER 1. There was no difference between the rate of the molecular weights decrease for drug free TER1 and TER1 with drug. The slowest decrease of the molecular weight was observed for 1% TER2. The drug free TER2 matrices showed similar decrease of molecular weight as TER1 matrices.

TABELA 3. Porównanie mikrostruktury różnych matryc polimerowych TER2 przed procesem degradacji i po 13 tygodniach degradacji.

TABLE 3. Comparison of polymer microstructure of the various TER2 matrices, before and after 13 weeks of degradation.

Rodzaj matrycy Type of matrices	Degradacja Degradation [tygodnie/weeks]	^a F _{LL}	^a F _{GG}	^a F _{TMC}	^ρ F _{LL}	^a ^ρ F _{GG}	^a ^ρ F _{TMC}
matryca TER2 0% simwastatyny drug free TER2 matrix	0	67	10	23	7.01	1.20	14.71
	13	66	9	25	6.7	1	13
matryca 1% simwastatyny TER2 1% of simvastatin TER2 matrix	0	67	11	22	7.02	1.20	14.68
	13	66	9	24	6	1	13

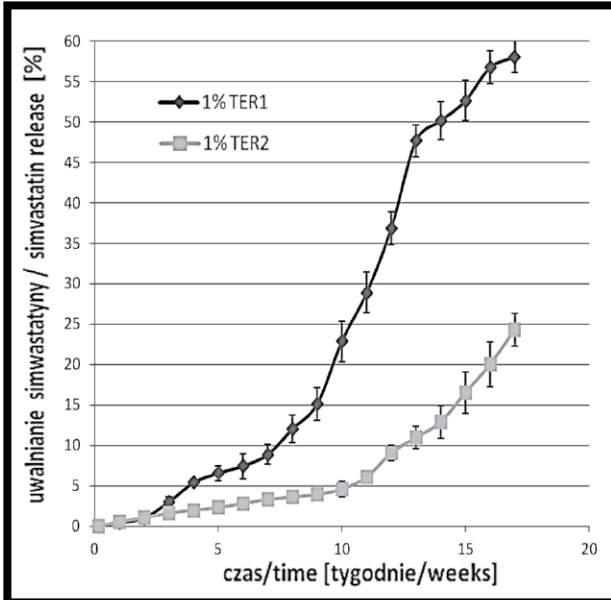
^a wyniki NMR / ^a NMR results

Na podstawie badań NMR materiału polimerowego TER2 (TABELA 3) stwierdzono, że dodatek 1% simwastatyny nie miał istotnego wpływu na zmianę mikrostruktury podczas degradacji. Zarówno matryce TER2 nie zawierające leku oraz matryce zawierające 1% simwastatyny, po 13 tygodniach degradacji charakteryzowały się mniejszą procentową zawartością jednostek laktydylowych (F_{LL}) i glikolidylowych (F_{GG}) oraz nieznacznie większym udziałem procentowym jednostek węglanowych (F_{TMC}), w porównaniu do materiałów przed degradacją. Po 13 tygodniach inkubacji w PBS, odnotowano niewielki spadek średnich długości bloków laktydylowych (^ρF_{LL}), glikolidylowych (^ρF_{GG}) oraz węglanowych (^ρF_{TMC}). Materiał w czasie 13 tygodni degradacji in vitro zachowywał jednak stabilność mikrostruktury.

Zbadano profil uwalniania simwastatyny z matryc terpolimerowych. Zaobserwowano odmienny profil uwalniania dla materiałów różniących się mikrostrukturą (RYS. 6, 7, 8). Polimer TER1 dzięki większej ilości krótszych sekwencji statystycznych w łańcuchu, tworzących fazę amorficzną i krótkich mikroblokach laktydylowych, degradował znacznie szybciej niż TER2. Potwierdzają to doniesienia literaturowe o wpływie struktury polimeru na przebieg degradacji. Nieuporządkowane regiony amorficzne degradują znacznie szybciej od krystalicznych [6]. Większa ilość leku uwolniła się zatem z matryc wykonanych z TER1, ulegającego szybszej degradacji. W przypadku 1% matrycy TER1 zaobserwowano nierównomierny proces uwalniania leku, w wyniku którego do 17 tygodnia uwolniło się prawie 60% simwastatyny.

NMR analysis of TER2 (TABLE 3) revealed that the addition of 1% of simvastatin did not have any significant impact on the change of microstructure during degradation. Both, the TER2 matrices containing drug and simvastatin free matrices, after 13 weeks of degradation characterized lower percentage of lactidyl units (F_{LL}) and glycolidyl units (F_{GG}) as well as higher content of carbonate (F_{TMC}) units, compared to these systems before degradation. After 13 weeks of the incubation in PBS, there was little decrease in the average lengths of lactidyl (^ρF_{LL}), glycolidyl (^ρF_{GG}) and carbonate (^ρF_{TMC}) blocks. The microstructure of the material did not change during the 13 weeks of in vitro degradation.

The release profile of simvastatin from the tested matrices obtained from terpolymers was also investigated. Different release profiles from materials with various microstructure have been noticed (FIGs. 6, 7, 8). Polymer TER1 degraded much faster than TER2, because of higher amount of short lactidyl blocks and random sequences forming amorphous phase. It confirms that the polymer microstructure influences the mechanism of degradation that has also been published in the literature. It can be concluded that amorphous regions are hydrolyzed faster than crystalline regions [6]. The matrices made of faster degrading TER1 released much more drug. Cumulative amount of released simvastatin from 1% TER1 matrix fluctuated and was instable, reaching nearly 60% at 17th week of the experiment.

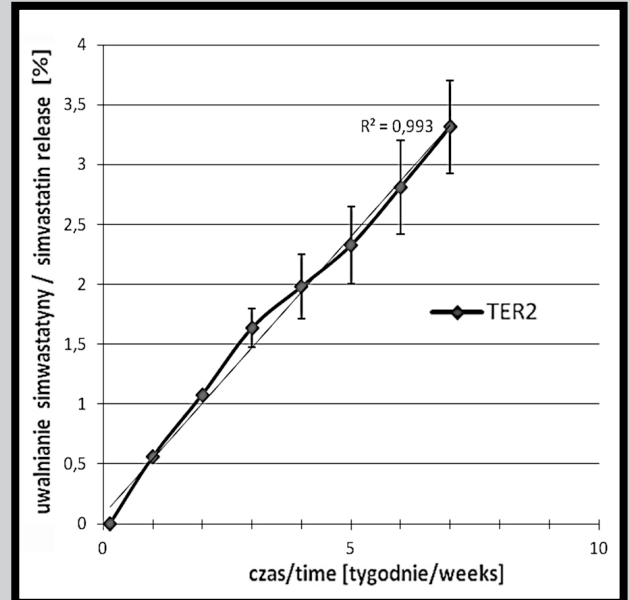


RYS. 6. Procentowa ilość uwolnionej simwastatyny z matryc wykonanych z TER1 i z TER2 (średnia \pm SD; n=3).

FIG. 6. Cumulative release of simvastatin from TER1 and TER2 matrices (each point represents the average \pm SD; n=3).

Stwierdzono ścisłą korelację uwalniania leku z szybkością degradacji (całkowitym ubytkiem masy) terpolimeru TER1. Najprawdopodobniej uwalnianie leku następuje wraz z erozją matrycy na skutek wymywania rozpuszczalnych produktów degradacji.

Terpolimer TER2 zawierający w łańcuchu polimerowym dłuższe bloki laktydylowe i bardziej uporządkowaną strukturę niż TER1 degradował wolniej. Zarówno regiony krystaliczne pochodzące od grup laktydylowych jak i wbudowane oligomery TMC zwiększyły jego odporność na degradację. Uwalnianie simwastatyny z TER2 było niewielkie i zachodziło liniowo w pierwszych 7 tygodniach degradacji, osiągając wartość 3% całkowitej ilości leku wprowadzonego do matrycy (RYS. 7). W czasie 17 tygodni uwolniło się niecałe 30% leku z matrycy TER2 (RYS. 6 i 7). Uwalnianie simwastatyny również w przypadku tego materiału jest związane z erozją matrycy - ilość uwolnionego leku jest proporcjonalna do procentowego całkowitego ubytku masy polimeru.

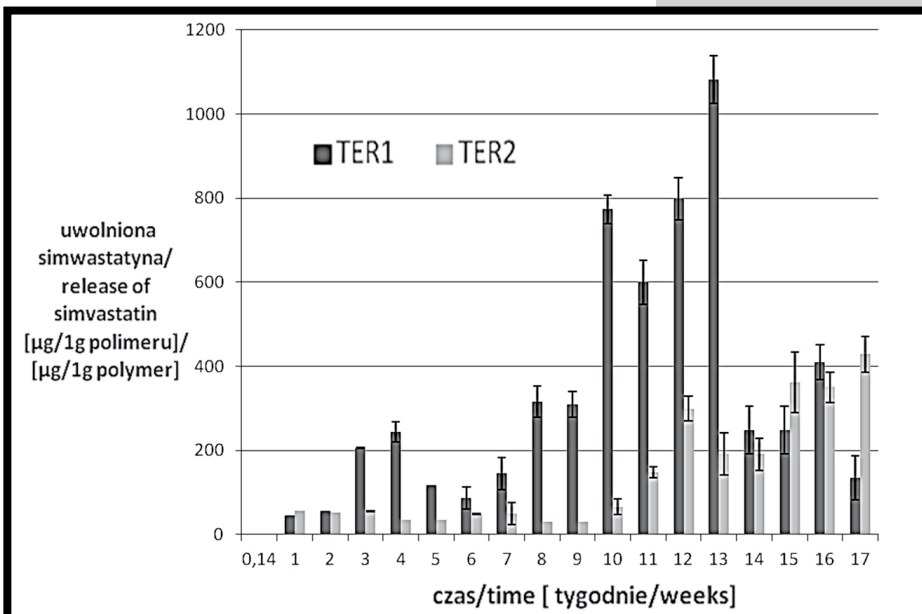


RYS. 7. Procentowa ilość uwolnionej simwastatyny z matryc wykonanych z TER2 w pierwszych siedmiu tygodniach degradacji (średnia \pm (SD); n=3).

FIG. 7. Cumulative release of simvastatin from TER2 matrices in first 7 weeks of degradation (each point represents the average \pm SD; n=3).

It is highly correlated with the loss of the total weight of the samples TER1. The release of the drug, most likely, occurs together with erosion of the matrix due to leaching out of soluble degradation products.

Terpolymer TER2 containing longer lactidyl blocks in polymer chain and less random structure than TER1 degraded slower. Both, crystalline regions derived from lactidyl groups and using of TMC - oligomers for synthesis of polymer have increased its resistance to degradation. Simvastatin release from slow degrading TER2 containing longer lactidyl and carbonate blocks was slow and linear during the first 7 weeks of degradation, reaching a value of 3% of the total amount of the incorporated drug (FIG. 7). Less than 30% of drug was released from TER2 matrix (FIGs. 6 and 7) during the 17 weeks. The simvastatin release from this polymer is also determined mainly by erosion of the matrix.



RYS. 8. Profil uwalniania simwastatyny z matryc wykonanych z TER1 i z TER2 w czasie 17 tygodni (średnia \pm SD; n=3).

FIG. 8. Release profile of simvastatin from TER1 and TER2 matrices during 17 weeks (average \pm SD; n=3).

Wnioski

Terpolimer TER2 zawierający w swojej strukturze bloki laktydylowe i węglanowe degradował wolniej od materiału o mniejszym stopniu uporządkowania komonomerów w łańcuchu polimerowym (TER1). Zawartość 1% simwastatyny nie miała istotnego znaczenia na przebieg procesu degradacji badanych materiałów w czasie 17 tygodni.

Stwierdzono, iż uwalnianie simwastatyny z TER2 zachodzi liniowo, ale na bardzo niskim poziomie w pierwszych 7 tygodniach degradacji, ponieważ z matrycy ubyło jedynie 3% leku. Powolny proces uwalniania leku może wynikać z powolnej degradacji TER2 (ubytek całkowitej masy matrycy TER2 wyniósł tylko 5%). Zaobserwowano zatem, iż proces uwalniania simwastatyny jest ściśle skorelowany z szybkością degradacji matryc polimerowych. Najprawdopodobniej wynika to z faktu, że simwastatyna jako lek hydrofobowy praktycznie nie ulegała uwolnieniu na drodze dyfuzji, tylko na skutek erozji polimeru i wymywania z matrycy wraz z niskcząsteczkowymi produktami degradacji.

Podziękowania

Pracę wykonano w ramach projektu rozwojowego „Polimerowe chirurgiczne systemy resorbowalne z pamięcią kształtu” POIG UDA 01-03-123/08-04 współfinansowanego przez Unię Europejską - Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego oraz badań Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, umowa nr KNW-1-0-071/D/1/0.

Autorka Anna Jaros otrzymywała w roku akademickim 2011/2012 stypendium w ramach projektu „DoktoRIS – Program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

Conclusions

Terpolymer 2 (TER2) composed of longer lactidyl and carbonate blocks degraded slower than more statistical material TER1. The incorporation of 1% of simvastatin had no significant impact on the 17 weeks degradation process of tested materials. Simvastatin release from TER2 matrices was slow, linear within the first 7 weeks of degradation and reached a value of 3% of the drug initially incorporated into the matrix. Simultaneously, the total mass of TER2 matrix was just 5% and remained practically unchanged. The water uptake was below 20%. It was observed that the process of simvastatin release closely correlated with the total weight lost [%] of the matrices. Probably this is due to the fact that simvastatin as a hydrophobic drug was practically not released by diffusion, but mainly by erosion and elution from the matrix along with the low molecular weight degradation products.

Acknowledgments

This study has been financially supported by MEMSTENT (Grant No: UDA-POIG.01.03.01-00-123/08-04) co-financed by the European Union, and Medical University of Silesia in Katowice (Grant No KNW-1-0-071/D/1/0).

Regional Scholarship Fund for PhD Students “DoktoRIS” the academic year 2011/2012 co-financed by the European Union.

Piśmiennictwo

- [1] Lendlein A., Pierce B., Grijpma D.: Introduction to Advanced Polymers in medicine. *Macromol. Symp.* 309/310 (2011)1-5.
- [2] Lendlein A., Behl M., Hiebl B., Wischke Ch.: Shape-memory polymers as a technology platform for biomedical applications. *Expert Rev. Med. Devices* 7(3) (2010) 357-379.
- [3] Bettinger. Ch. J.: Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering and Cell–Biomaterial Interactions. *Review. Macromol. Biosci.* 11 (2011) 467-482.
- [4] Feng Y., Zhao H., Jiao L., Lu J., Wang H., Guo J.: Synthesis and characterization of biodegradable, amorphous, soft IPNs with shape-memory effect. *Polym. Adv. Technol.* 23 (2012) 382-388
- [5] Gębarowska K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Scandola M., Zini E., Li S.: NMR analysis of the chain microstructure of biodegradable terpolymers with shape memory properties. *Eur Polym J* 47 (2011) 1315-1327.
- [6] Kasperczyk J., Li S., Jaworska J., Dobrzyński P., Vert M.: Degradation of copolymers obtained by ring-opening polymerization of glycolide and 3-caprolactone: A high resolution NMR and ESI-MS study. *Polymer Degradation and Stability.* 93 (2008) 990-99.
- [7] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Paluszkiewicz C., Jaworska J., Kasperczyk J., Dobrzyński P.: FTIR and NMR study of poly(lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite implant degradation under in vivo conditions. *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009) 1479-1485.
- [8] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compounds. V. Multiblock and random copolymers of L-lactide with trimethylene Carbonate obtained in copolymerization initiated with zirconium (IV) acetylacetonate. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 44 (2006) 3184-3201.

References

- [9] Zini E., Scandola M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Shape Memory Behavior of Novel (L-Lactide-Glycolide-Trimethylene Carbonate) Terpolymers. *Biomacromolecules*, 8 (2007) 3661-3667.
- [10] Smola A., Dobrzyński P., Pastusiak M., Sobota M., Kasperczyk J.: New semi-crystalline bioresorbable materials with shape-memory properties. *Engineering of Biomaterials.* 89-91 (2009) 82-87.
- [11] Smola A., Dobrzyński P., Sobota M., Pastusiak M., Kaczmarczyk B., Kasperczyk J.: Preliminary tests of forming bioresorbable stent models with shape memory properties intended to use in lower respiratory tract treatment. *Engineering of Biomaterials* 96-98 (2010) 93-98.
- [12] Rashidi H., Ellis M. J., Cartmell S., Chaudhuri J.: Simvastatin Release from Poly(lactide-co-glycolide) Membrane Scaffolds. *Polymers* 2 (4) (2010) 709-718.
- [13] Tomomi Tanigo T., Ryohei Takaoka R., Yasuhiko Tabata Y.: Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *Journal of Controlled Release* 143 (2010) 201-206.
- [14] Kokoszka E., Padaszyński P., Dzierżewicz Z., Kasperczyk J.: Nowe spojrzenie na możliwości terapeutyczne simwastatyny. *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy* 7 (2009) 16-20.
- [15] Markland P., Yang V. C.: Biodegradable polymers as drug carriers. [In:] Swarbrick S, ed. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* Informa Healthcare (2006) 176-193.



.....

STUDIA PODYPLOMOWE
Biomateriały – Materiały dla Medycyny
2013/2014

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów, a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2013 do 20.10.2013 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Miejsce zgłoszeń: Kraków, Al. Mickiewicza 30, Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 Osoby przyjmujące zgłoszenia: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Mgr inż. Małgorzata Krok (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
Czas trwania: 2 semestry (od XI 2013 r. do VI 2014 r.)	Opłaty: 2 600 zł
Informacje dodatkowe: Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.	

