

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 120
Numer 120
Volume XVI
Rok XVI

JULY 2013
LIPIEC 2013

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: 250 copies
Nakład: 250 egz.

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



**EDITORIAL BOARD
KOMITET REDAKCYJNY**

EDITOR-IN-CHIEF

Jan Chłopek - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

EDITOR

Elżbieta Pamuła - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

Lucie Bacakova - ACADEMY OF SCIENCE OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Romuald Będziński - WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Stanisław Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Andrzej Górecki - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Wojciech Maria Kuś - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Roman Pampuch - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM

Jacek Składzień - JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKOW, POLAND

Andrei V. Stanishevsky - UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM, USA

Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND

Tadeusz Trzaska - UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ, POLAND

Dimitris Tsiapas - 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. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie.
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo
 „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
 Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
 Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
 al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków
 tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61
 tel./fax: (48) 12 617 45 41
 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma:

www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy 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 (200-250 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). 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 Śląski S.A.

account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

*XXIII Conference on
BIOMATERIALS
IN MEDICINE
AND
VETERINARY
MEDICINE*

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

www.biomat.agh.edu.pl



SPIS TREŚCI

ELEKTROPRZĘDZENIE I LIOFILIZACJA JAKO METODY OTRZYMYWANIA PODŁOŻY DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ PATRYCJA DOMALIK-PYZIK, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, AGATA WRONA, JAN CHŁOPEK, IZABELLA RAJZER	2
OCENA STABILNOŚCI TERMICZNEJ PROSZKÓW ZrO₂ MODYFIKOWANYCH TLENKAMI MgO ORAZ Y₂O₃ DAMIAN NAKONIECZNY, ZBIGNIEW PASZENDA, WITOLD WALKE	8
MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI WARSTW TLENOAZOTOWANYCH WYTWORZONYCH W OBRÓBCE HYBRYDOWEJ W NISKOTEMPERATUROWEJ PLAZMIE MICHAŁ TARNOWSKI, AGNIESZKA SOWIŃSKA, JUSTYNA OLEKSIK, TOMASZ BOROWSKI, ELŻBIETA CZARNOWSKA, TADEUSZ WIERZCHOŃ	13
MIKROGRANULE HYDROKSYAPATYTOWE POKRYWANE POLI(D,L-LAKTYDEM) JAKO IMPLANT KOSTNY I NOŚNIK ANTYBIOTYKU AGNIESZKA JELONEK, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA, PAWEŁ MYCIŃSKI, JOANNA ZARZECKA	19
OCENA BUDOWY CHEMICZNEJ, STRUKTURY FAZOWEJ ORAZ SAMOORGANIZACJI MAKROZĄSTECZEK POLI(ALIFATYCZNO/ AROMATYCZNYCH-ESTRO-AMIDO-ETERÓW) (PAAEAE) JOANNA GAJOWY, MIROŚLAWA EL FRAY	30
WŁAŚCIWOŚCI STOPU Ti-6Al-4V PO MODYFIKACJI POWIERZCHNI GRZEGORZ ADAMEK, JAROSŁAW JAKUBOWICZ	35
EFEKTY UTLENIANIA TYTANU PO RÓŻNYCH METODACH MODYFIKACJI POWIERZCHNI JÓZEF JASIŃSKI, MAŁGORZATA LUBAS, JAROSŁAW JASIŃSKI, PAWEŁ WIECZOREK	41

CONTENTS

ELECTROSPINNING AND FREEZE-DRYING AS METHODS FOR FABRICATION OF TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS PATRYCJA DOMALIK-PYZIK, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, AGATA WRONA, JAN CHŁOPEK, IZABELLA RAJZER	2
EVALUATION OF THERMAL STABILITY OF ZrO₂ POWDERS MODIFIED WITH MgO AND Y₂O₃ DAMIAN NAKONIECZNY, ZBIGNIEW PASZENDA, WITOLD WALKE	8
MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF OXYNITRIDED SURFACE LAYER PRODUCED UNDER HYBRID LOW TEMPERATURE PLASMA TREATMENT MICHAŁ TARNOWSKI, AGNIESZKA SOWIŃSKA, JUSTYNA OLEKSIK, TOMASZ BOROWSKI, ELŻBIETA CZARNOWSKA, TADEUSZ WIERZCHOŃ	13
HYDROXYAPATITE MICROSPHERES COATED WITH POLY(D,L-LACTIDE) AS BONE FILLER AND ANTIBIOTIC DELIVERY SYSTEM AGNIESZKA JELONEK, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA, PAWEŁ MYCIŃSKI, JOANNA ZARZECKA	19
EVALUATION OF CHEMICAL STRUCTURE, MICROPHASE SEPARATION AND SELF-ASSEMBLING OF POLY(ALIPHATIC/ AROMATIC-ESTER-AMIDE-ETHER)S (PAAEAE)S JOANNA GAJOWY, MIROŚLAWA EL FRAY	30
PROPERTIES OF THE BIOFUNCTIONALIZED SURFACE OF Ti-6Al-4V ALLOY GRZEGORZ ADAMEK, JAROSŁAW JAKUBOWICZ	35
TITANIUM OXIDATION EFFECTS AFTER VARIOUS SURFACE MODIFICATION METHODS JÓZEF JASIŃSKI, MAŁGORZATA LUBAS, JAROSŁAW JASIŃSKI, PAWEŁ WIECZOREK	41

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

ELEKTROPRZĘDZENIE I LIOFILIZACJA JAKO METODY OTRZYMYWANIA PODŁOŻY DLA INŻYNIERII TKANKOWEJ

PATRYCJA DOMALIK-PYZIK^{1*}, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ¹,
AGATA WRONA¹, JAN CHŁOPEK¹, IZABELLA RAJZER²

¹ AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

² AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA W BIELSKO-BIAŁEJ,
KATEDRA PODSTAW BUDOWY MASZYN,
ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIAŁA

* E-MAIL: PDOMALIK@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Inżynieria tkankowa to interdyscyplinarna dziedzina, której celem jest opracowanie biologicznych substytutów pozwalających na zastąpienie i regenerację uszkodzonej tkanki. Bardzo ważnym jej elementem są podłoża, które stanowią rusztowanie umożliwiające wzrost i różnicowanie się odpowiednich komórek. Przedmiotem niniejszych badań było wytworzenie podłoży z polilaktidu i polikaprolaktonu. Materiały te formowano w dwóch procesach: na drodze elektroprzędzenia z roztworu polimeru oraz poprzez liofilizację, czyli suszenie sublimacyjne. Uzyskano w ten sposób podłoża o różnych właściwościach mechanicznych i mikrostrukturze. Wykazano zasadniczy wpływ metody i parametrów otrzymywania podłoży na ich końcowe właściwości. Wynikiem elektroprzędzenia są materiały włókniste o dużej odkształcalności, podczas gdy liofilizacja prowadzi do wytworzenia porowatych materiałów o wyższej wartości wytrzymałości mechanicznej i modułu Younga. Znaczący wpływ na parametry mechaniczne ma także forma podłoży nanowłóknistych. Podłoża w kształcie rurki cechują się wyższymi parametrami mechanicznymi niż w kształcie płaskich mat. Dodatkowo, wzrost wytrzymałości uzyskano poprzez owinięcie rurek włóknami alginianowymi. Połączenie metod elektroprzędzenia i liofilizacji prowadzi do wytworzenia asymetrycznych podłoży o wyższych parametrach mechanicznych. Metodą elektroprzędzenia otrzymano nanowłókniste materiały w formie mat i rurek, nadające się na podłoża do regeneracji naczyń krwionośnych. Liofilizacja pozwoliła natomiast na wytworzenie podłoży o różnej porowatości i morfologii. Dzięki połączeniu obu metod otrzymano asymetryczne podłoża PLAel/PCL40, które mogą znaleźć zastosowanie w sterowanej regeneracji tkanki kostnej.

Słowa kluczowe: elektroprzędzenie, liofilizacja, polilaktid, polikaprolaktan

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 2-7]

ELECTROSPINNING AND FREEZE-DRYING AS METHODS FOR FABRICATION OF TISSUE ENGINEERING SCAFFOLDS

PATRYCJA DOMALIK-PYZIK^{1*}, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ¹,
AGATA WRONA¹, JAN CHŁOPEK¹, IZABELLA RAJZER²

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

² ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS,
DIVISION OF MATERIALS ENGINEERING,
WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

* E-MAIL: PDOMALIK@AGH.EDU.PL

Abstract

Tissue engineering is an interdisciplinary field which purpose is to produce biological substitutes able to replace and regenerate damaged tissue. Scaffolds are very important components because they allow growth and proliferation of appropriate cells. The purpose of this study was to manufacture different scaffolds using polylactide (PLA) and polycaprolactone (PCL). Materials were formed in two processes: electrospinning of a polymer solution and freeze-drying. Therefore it was possible to obtain scaffolds with various mechanical properties and microstructure. The influence of scaffold fabrication method and parameters on its final properties was demonstrated. Electrospinning outcomes were fibrous materials with high deformability, while freeze-drying led to fabrication of porous materials with higher mechanical strength and Young's modulus. The shape of nanofibrous scaffolds had also a significant influence on their mechanical properties. Scaffolds in the shape of a tube were characterized by higher mechanical properties than those in the shape of flat mats. Additional increase in mechanical strength has been achieved by wrapping the tubes with alginate fibers. Combination of electrospinning and freeze-drying contributed to formation of asymmetric scaffolds with better mechanical properties. Nanofibrous materials in the shape of mats and tubes, suitable for vascular engineering scaffolds were fabricated by electrospinning, while freeze-drying allowed for fabrication of scaffolds varying in porosity and morphology. Asymmetric PLAel/PCL40 scaffolds suitable for guided bone regeneration (GBR) were manufactured as a result of combining two above-mentioned methods.

Keywords: electrospinning, freeze-drying, polylactide, polycaprolactone

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 2-7]

Wprowadzenie

Zasadniczym celem inżynierii tkankowej jest opracowanie biologicznych substytutów, które pozwolą na przywrócenie funkcji uszkodzonej tkanki poprzez jej zastąpienie i regenerację. Główne jej komponenty, znane jako triada inżynierii tkankowej to komórki, czynniki wzrostu oraz podłoża. Te ostatnie stanowią swego rodzaju rusztowania, które umożliwiają wzrost i różnicowanie się komórek oraz organizację skomplikowanej architektury tkanki. Podłoża przeznaczone dla inżynierii tkankowej muszą spełniać określone wymagania. Przede wszystkim muszą to być struktury trójwymiarowe, charakteryzujące się biokompatybilnością i biodegradowalnością. Muszą ponadto posiadać parametry mechaniczne dopasowane do regenerowanej tkanki oraz mikrostrukturę o wysokiej porowatości i sieci połączonych ze sobą porów w dostosowanym do komórek rozmiarze [1,2]. Istnieją bardzo różne metody otrzymywania takich podłoży [3], między innymi elektroprzędzenie oraz liofilizacja, którymi posłużono się w trakcie badań.

Elektroprzędzenie to metoda pozwalająca na otrzymywanie nanowłókien z szeregu różnych materiałów, w tym szczególnie z materiałów polimerowych. W uproszczeniu proces elektroprzędzenia polega na formowaniu nanowłókien z ciągłego strumienia płynu (np. roztworu polimeru) w obecności pola elektrycznego. Zmieniając takie parametry jak: przyłożone napięcie, szybkość dozowania roztworu, czy odległość dozownik-kolektor można sterować morfologią otrzymywanych włókien. Ponadto istotną rolę odgrywają parametry samego roztworu, czyli jego lepkość oraz lotność i przewodnictwo rozpuszczalnika [4,5]. Metoda liofilizacji pozwala z kolei na wytwarzanie wysoko porowatych podłoży i membran o kontrolowanym rozmiarze porów. W tym procesie porowata struktura uzyskiwana jest na skutek sublimacji kryształów rozpuszczalnika w warunkach próżni w liofilizatorze [6].

Przeprowadzone badania miały na celu otrzymanie różnych podłoży dla inżynierii tkankowej na drodze elektroprzędzenia i liofilizacji. Określono wpływ parametrów procesu i metody otrzymywania na końcowe właściwości materiałów.

Materiały i metody

W celu otrzymania próbek do badań posłużono się dwiema metodami: elektroprzędzeniem oraz liofilizacją. Metodą elektroprzędzenia (urządzenie TIC 1092012) otrzymano płaskie włókniny oraz rurki (średnica wewnętrzna 5 mm) z polilaktydu (PLA, Ingeo™ 3051D) i polikaprolaktonu (PCL, Sigma-Aldrich, $M_n = 80\ 000$). Dokładne parametry procesu i skład poszczególnych roztworów zebrano w TABELI 1. W celu zapewnienia dodatkowego wzmocnienia, owinięto część rurek PLA pasmami włókien alginianowych (PLAel_r/Alg).

Do procesu liofilizacji przygotowano dwa roztwory polilaktydu (PLA5 i PLA10, odpowiednio 5% i 10%) w 1,4-dioksanie (POCH) oraz trzy roztwory polikaprolaktonu (PCL10, PCL20 i PCL40, odpowiednio 1:10, 1:20 i 1:40 g/ml) w lodowatym kwasie octowym (99,5%-99,9% CZDA, POCH S.A.). Następnie po około 20 ml przygotowanych roztworów równomiernie rozprowadzono w szklanych szalkach o średnicy 10 cm i umieszczono na 0,5 h w temperaturze -20°C lub zanurzono w ciekłym azocie (PLA5n, PLA10n), w celu przejścia rozpuszczalnika w stan stały.

Introduction

The main purpose of tissue engineering is to formulate biological substitutes allowing for restoring of damaged tissue functions through its replacement or regeneration. Its main components, known as tissue engineering triad are cells, growth factors and scaffolds, which allow cell growth and differentiation as well as complex tissue architecture organisation. Scaffolds intended to be used in tissue engineering must fulfil certain requirements. First of all, those structures need to be three dimensional, biocompatible and biodegradable. Furthermore, they need to possess mechanical properties suitable for damaged tissue and microstructure with high porosity and interconnected pores matching cellular dimensions [1,2]. Various methods for fabrication of such scaffolds are known [3], for example electrospinning and freeze-drying which were used in this study.

Electrospinning is a method allowing for fabrication of nanofibers from variety of materials, particularly from polymers. In simple terms, electrospinning is a process that produces continuous polymer nanofibers from constant fluid stream (e.g. polymer solution) through the action of an external electric field. By changing such parameters as: applied voltage, flow rate, or capillary-collector distance it is possible to control morphology of resulting nonwovens. Additionally, solution parameters, like polymer concentration, volatility and conductivity of a solvent, play also an important role [4,5]. Freeze-drying method allows for fabrication of highly porous scaffolds and membranes with controlled pore size. In this process porous structure is achieved through solvent crystals sublimation under vacuum conditions in freeze-dryer [6].

The purpose of this study was to fabricate various tissue engineering scaffolds by electrospinning and freeze-drying. The influence of processing parameters and fabrication method on final properties of the material was evaluated.

Materials and Methods

Two methods: electrospinning and freeze-drying were used in order to obtain specimens for the study. Flat nonwovens and tubes (5 mm inner diameter) made of polylactide (PLA, Ingeo™ 3051D) and polycaprolactone (PCL, Sigma-Aldrich, $M_n = 80\ 000$) were formulated through electrospinning (TIC 1092012 apparatus). Detailed process parameters and solutions composition are summarized in TABLE 1. Some of the tubes (PLAel_r/Alg) were wrapped in alginate fibres formed into strands for additional reinforcement.

TABELA 1. Parametry procesu elektroprzędzenia włókien (PLAel, PCLel) oraz rurek (PLAel_r, PCLel_r).

TABLE 1. Electrospinning parameters of nonwoven fabrics (PLAel, PCLel) and tubes (PLAel_r, PCLel_r).

Próbka Sample		Parametry elektroprzędzenia / Electrospinning parameters				
		roztwór solution	napięcie voltage [kV]	obroty kolektora collector rotation [RPM]	odległość dozownik- kolektor batcher- collector distance [cm]	średnica igły needle diameter [mm]
PLA	PLAel	2.5 g PLLA/ 30 ml chloroform/ 10 ml methanol	28.2	330	20	0.70
	PLAel_r		13.4			
PCL	PCLel	10 g PCL/ 80 ml chloroform/ 80 ml methanol	30.0	230	30	0.92
	PCLel_r		20.0	415	20	0.51

Próbki liofilizowano (Labconco Freezone) w warunkach wysokiej próżni (0,03 Torr), w temperaturze -50°C przez okres 24 h. W wyniku liofilizacji otrzymano płaskie podłoża o zróżnicowanej mikrostrukturze.

Wykonano także asymetryczne materiały, łącząc opisane wyżej metody. W technice łączonej włókniny polilaktydowe umieszczano na szklanych podstawkach i zalewano około 15 ml roztworu PCL40, następnie całość wymrażano w -20°C przez 0,5 h i liofilizowano przez kolejne 24 h.

W celu oceny wpływu metody otrzymywania oraz parametrów procesu na właściwości materiału przeprowadzono badania mechaniczne (próba rozciągania, uniwersalna maszyna wytrzymałościowa Zwick 7000 typu 1435) oraz dokonano oceny mikrostruktury materiału przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego NOVA NANO SEM 200 produkcji FEI EUROPE COMPANY.

Wyniki i dyskusja

Obrazy mikroskopowe SEM pokazują, że poszczególne podłoża otrzymane na drodze liofilizacji znacznie różnią się od siebie pod względem mikrostrukturalnym. Podłoża polilaktydowe (RYS. 1A-C) są prawie nieporowate lub charakteryzują się porowatością zamkniętą, podczas gdy te z polikaprolaktonu w zależności od stężenia roztworu wyjściowego charakteryzują się odmienną porowatością - 10% dla PCL10 (RYS. 1D), 20% dla PCL20 (RYS. 1E), 80% dla PCL40 (RYS. 1F). Na przykładzie PLA widoczny jest ponadto wpływ sposobu chłodzenia na końcową mikrostrukturę membrany. Próbka PLA5n, która przed liofilizacją została zanurzona w ciekłym azocie, posiada znaczną ilość porów na powierzchni (RYS. 1A), natomiast próbka tego samego rodzaju wymrażana przez 0,5 h w -20°C charakteryzuje się niemal gładką powierzchnią z nielicznymi, pojedynczymi porami. Oprócz sposobu chłodzenia, na końcową morfologię podłoży wpływ ma także równomierność tego procesu w całej objętości próbki. Widoczne na obrazach SEM nierówności mikrostruktury wynikają prawdopodobnie z nierównomiernego schłodzenia próbek.

Najkorzystniejszą mikrostrukturę ze względu na możliwość potencjalnego zastosowania np. na membranę do sterowanej regeneracji kości lub podłoża do hodowli tkanki kostnej, prezentuje próbka PCL40. Jej główne zalety to znaczna porowatość oraz połączone ze sobą, wydłużone pory o średniej średnicy $80\ \mu\text{m}$.

Różnice w mikrostrukturze próbek (RYS. 1) przekładają się na różnice we właściwościach mechanicznych. Na RYS. 2 przedstawiono wartości wytrzymałości na rozciąganie, modułu Younga oraz maksymalnego wydłużenia próbek polilaktydowych otrzymanych różnymi metodami. Nanowłókniny PLA otrzymane na drodze elektroprzędzenia posiadają niską wytrzymałość i moduł sprężystości, lecz wykazują znaczną odkształcalność. Odwrotnie w przypadku polilaktydu poddanego liofilizacji - odkształcalność jest niewielka, natomiast wytrzymałość niemal trzykrotnie wyższa niż w przypadku włókniny. Różnice w parametrach mechanicznych tych materiałów wynikają z ich różnej mikrostruktury i porowatości. Wysoka porowatość nanowłóknin skutkuje niższą wytrzymałością, natomiast prostowanie nanowłóknien w procesie rozciągania zwiększa ich elastyczność. W przypadku materiałów liofilizowanych różnice generowane są także wyjściowym stężeniem roztworu polimeru. Wyższe wartości parametrów mechanicznych uzyskano dla PLA otrzymanego z roztworu 10% (PLA10) niż 5% (PLA5), co także wynika z jego mniejszej porowatości.

Two poly lactide solutions (PLA5 i PLA10, 5% and 10%, respectively) in 1,4 dioxane (POCH) and three polycaprolactone solutions (PCL10, PCL20 and PCL40, 1:10, 1:20 and 1:40 g/ml, respectively) in glacial acetic acid (99.5%-99.9% CZDA, POCH S.A.) were prepared for freeze-drying. Subsequently about 20 ml of each solution was evenly poured on a glass plate with 10 cm diameter and then placed for 0.5 h at -20°C or immersed in liquid nitrogen (PLA5n, PLA10n) for changing of liquid solvent into solid. Samples were freeze-dried (Labconco Freezone) in high vacuum conditions (0.03 Torr) and temperature of -50°C for 24 h. Resulting scaffolds were characterized by different microstructure.

There were also asymmetric materials fabricated by combining previously mentioned methods. In combined technique, poly lactide nonwoven was placed on a glass surface and impregnated with about 15 ml of PCL40 solution and then frozen at -20°C for 0.5 h and freeze-dried for the following 24 h.

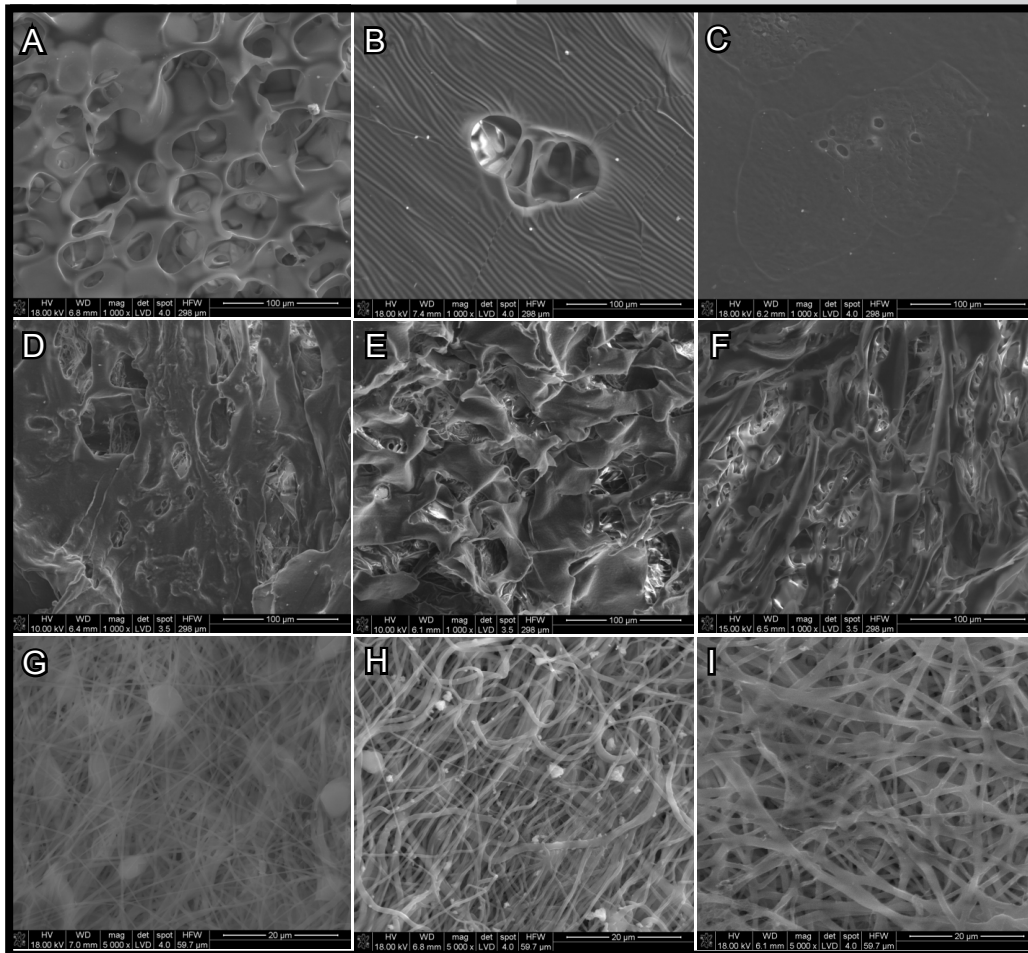
There were mechanical studies (tensile test, universal testing machine Zwick 7000 1435 type) conducted for assessment of influence of fabrication method and process parameters on material properties. Material microstructure was assessed on scanning electron microscop (NOVA NANO SEM 200, FEI EUROPE COMPANY).

Results and Discussions

SEM images show that individual scaffolds obtained through freeze-drying vary significantly in microstructure. Poly lactide scaffolds (FIG. 1A-C) are almost nonporous or characterized only by closed porosity, while those made of polycaprolactone have different porosity, depending on the initial solution concentration - 10% for PCL10 (FIG. 1D), 20% for PCL20 (FIG. 1E), 80% for PCL40 (FIG. 1F). As one can see with PLA, the rate of freezing had also an influence on final membrane microstructure. PLA5n sample, which was immersed in liquid nitrogen prior to freeze-drying, had a lot of pores on the surface (RYS. 1A), while respective sample but frozen for 0.5 h at -20°C had almost smooth surface with sparse, single pores. Both the rate of freezing and the freeze-drying process uniformity in the volume of the whole sample affected the final morphology of the scaffold. Microstructure inhomogeneities visible in SEM images are probably due to uneven cooling of the samples.

PCL40 sample exhibited the best microstructure considering possibility of potential application as a membrane for guided bone regeneration or scaffold for bone tissue culture. High porosity level and interconnected elongated pores with $80\ \mu\text{m}$ diameter are its main advantages.

Differences in samples microstructure (FIG. 1) are reflected in differences in mechanical properties. Values of tensile strength, Young's modulus and maximum elongation are shown in FIG. 2. PLA nonwovens obtained by electrospinning had low strength and elastic modulus, but exhibited high deformability. It is opposite with freeze-dried poly lactide - deformability was low, while tensile strength was almost three time higher than for nonwoven. Differences in mechanical properties of those materials derived from their various microstructure and porosity. High porosity of nonwovens caused lower strength, while straightening of nanofibers during tensile test increased the elasticity. When it comes to freeze-dried materials, the differences were also a result of initial concentration of the solution. In the case of PLA, higher mechanical properties were obtained for scaffold fabricated from 10% solution (PLA10) than from 5% (PLA5) what resulted from its lower porosity.



RYS. 1. Obrazy SEM próbek po liofilizacji: PLA5n (A), PLA5 (B), PLA10n (C), PCL10 (D), PCL20 (E), PCL40 (F), po elektroprzędzeniu: PLAel (G), PCLel_r (H) i po połączeniu obu metod: PLAel/PCL40 (I) (strona od PLAel).

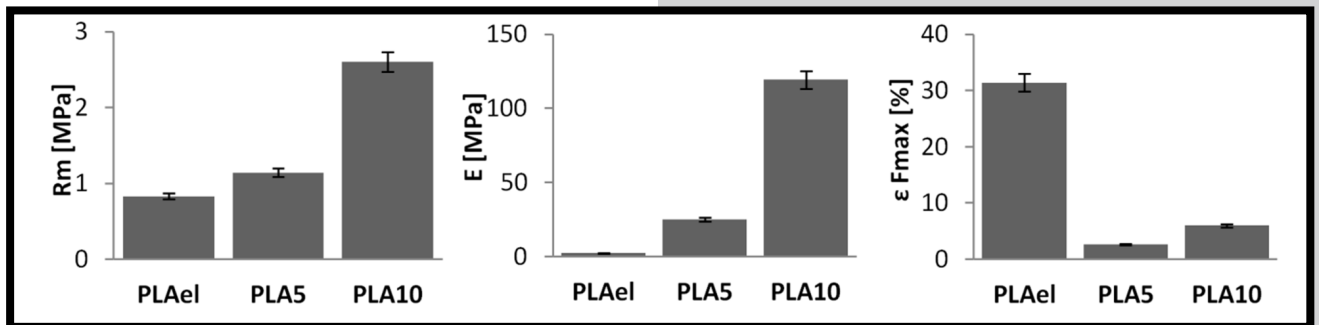
FIG. 1. SEM images of samples after freeze-drying: PLA5n (A), PLA5 (B), PLA10n (C), PCL10 (D), PCL20 (E), PCL40 (F), after electrospinning: PLAel (G), PCLel_r (H) and after combination of the two methods: PLAel/PCL40 (I) (PLAel side).

W przypadku polikaprolaktonu nie widać znaczących różnic w wytrzymałości mechanicznej (RYS. 3A) próbek otrzymywanych różnymi metodami. Ponadto różnice w wartościach modułu Younga tych próbek (RYS. 3B) są znacznie mniejsze niż w przypadku próbek polilaktydowych otrzymanych różnymi metodami. Jednak podobnie jak poprzednio wartość wydłużenia maksymalnego (RYS. 3C) jest najwyższa (niemal 40%) dla materiału nanowłóknistego. Wytrzymałość materiału PCL40 jest nieznacznie niższa od PCL20, co wynika z jego wyższej porowatości.

Kolejna modyfikacja, obok różnych metod otrzymywania i parametrów procesów, dotyczyła otrzymania struktur cylindrycznych, które mogłyby znaleźć zastosowanie między innymi w inżynierii naczyń krwionośnych. Podłoża te wykonano metodą elektroprzędzenia z roztworów PLA i PCL. Rurki (PLAel_r, PCLel_r) w porównaniu do włóknin (PLAel, PCLel) mają podobne lub wyższe wartości wytrzymałości i modułu Young'a (RYS. 4A,B), jednak charakteryzują się mniejszym maksymalnym wydłużeniem (RYS. 4C). Cylindryczne podłoża z polikaprolaktonu są bardziej wytrzymałe i odkształcalne niż te z polilaktydu, moduły Younga dla obu materiałów prezentują się podobnie. Zaproponowane dodatkowe wzmocnienie rurki PLA poprzez owinięcie wokół niej pasma włókien alginianowych, spowodowało ponad dwukrotne zwiększenie modułu sprężystości podłużnej, wpłynęło również na wyraźną poprawę wytrzymałości. Włókna alginianowe przeciwdziałają przemieszczaniu się nanowłókien względem siebie, usztywniając cylindryczne podłożo.

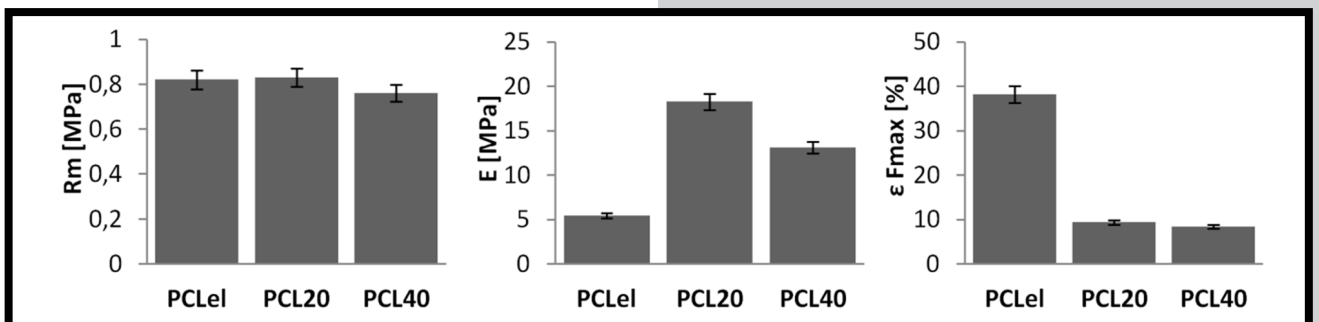
There were no significant differences in tensile strength of polycaprolactone samples fabricated by different methods (FIG. 3A). Additionally, differences in Young's modulus values for those samples (FIG. 3B) are smaller than in the case of polylactide samples obtained by different methods. However, similarly as previously, maximum elongation (FIG. 3C) was the highest (almost 40%) for nonwoven material. The strength of PCL40 material was slightly lower than of PCL20, what derived from its higher porosity.

Next modification, besides different fabrication methods and process parameters, considered obtaining cylindrical structures, which can be possibly used in vascular tissue engineering. Those scaffolds were fabricated by electrospinning from PLA and PCL solutions. In general, tubes (PLAel_r, PCLel_r) in comparison to nonwovens (PLAel, PCLel) exhibited similar or higher values of Young's modulus and tensile strength (FIG. 4A,B), however they had lower strain values (RYS. 4C). Cylindrical polycaprolactone scaffolds were more durable and deformable than those made of polylactide, Young's modulus for both materials were similar. Proposed additional reinforcement of PLA with alginate fibers formed into strands resulted in two times increased elastic modulus and significant improvement in tensile strength. Alginate fibers prevent nanofibers from moving between one other, stiffening the whole tubular scaffold.



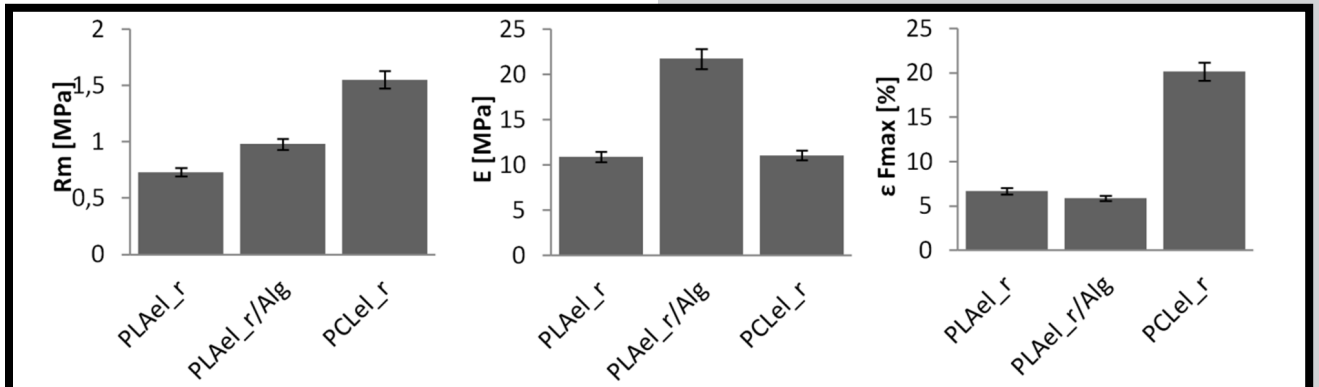
RYS. 2. Wytrzymałość na rozciąganie R_m (A), moduł Younga E (B) i odkształcenie $\epsilon_{F_{max}}$ (C) próbek polilaktydowych wykonanych technikami elektroprzędzenia (PLAel) oraz liofilizacji (PLA5, PLA10).

FIG. 2. Tensile strength R_m (A), Young's modulus E (B) and maximum elongation $\epsilon_{F_{max}}$ (C) of polylactide samples prepared using different methods of electrospinning (PLAel) and freeze-drying (PLA5, PLA10).



RYS. 3. Wytrzymałość na rozciąganie R_m (A), moduł Younga E (B) i odkształcenie $\epsilon_{F_{max}}$ (C) próbek z polikaprolaktonu wykonanych metodą elektroprzędzenia (PCLel) oraz liofilizacji (PCL20, PCL40).

FIG. 3. Tensile strength R_m (A), Young's modulus E (B) and maximum elongation $\epsilon_{F_{max}}$ (C) of polycaprolactone samples prepared using different methods of electrospinning (PCLel) and freeze-drying (PCL20, PCL40).



RYS. 4. Wytrzymałość na rozciąganie R_m (A), moduł Younga E (B) i odkształcenie $\epsilon_{F_{max}}$ (C) próbek o kształcie rurek uzyskanych w procesie elektroprzędzenia.

FIG. 4. Tensile strength R_m (A), Young's modulus E (B) and maximum elongation $\epsilon_{F_{max}}$ (C) of tube-shaped specimens obtained in electrospinning process.

W celu otrzymania asymetrycznych struktur przydatnych np. w sterowanej regeneracji kości (GBR) wykorzystano obie metody - elektroprzędzenie i liofilizację. W efekcie otrzymano materiał, którego jedną stronę stanowi sieć nanowłókien z polilaktydu, a drugą liofilizowany polikaprolakton o wysokiej porowatości i większym rozmiarze połączonych ze sobą porów. W TABELI 2 zestawiono właściwości mechaniczne faz składowych (PLAel, PCL40) i otrzymanego podłoża (PLAel/PCL40), które ma znacznie lepsze parametry mechaniczne. Prawdopodobnie doszło do częściowej impregnacji włókniny PLA roztworem PCL, w wyniku czego na granicy tych dwóch faz wytworzyła się kompozytowa warstwa pośrednia. Polikaprolakton usztywnił włókninę PLA, zmniejszając jej odkształcalność.

Both electrospinning and freeze-drying were used in order to obtain asymmetrical structures useful for example in guided bone regeneration (GBR). Material with one side comprised of nanofibrous polylactide mesh and the other of highly porous freeze-dried polycaprolactone was obtained as a result of the combined method. Mechanical properties of constituent phases (PLAel, PCL40) and obtained scaffold (PLAel/PCL40), which had considerably better mechanical properties, are summarized in TABLE 2. Presumably, there has been a partial impregnation of PLA nonwoven with PCL solution, which resulted in forming of composite interphase. Polycaprolactone stiffened polylactide nonwoven by reducing its deformability.

TABELA 2. Właściwości mechaniczne wybranych podłoży.
TABLE 2. Mechanical properties of selected scaffolds.

Material Material	Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [MPa]	Moduł Younga Young's modulus [MPa]	Odształcenie Maximum elongation [%]
PLAel	0.83 ± 0.04	2.27 ± 0.05	31.40 ± 2.37
PCL40	0.76 ± 0.23	13.11 ± 1.94	8.40 ± 2.61
PLAel/ PCL40	1.98 ± 0.24	150.43 ± 4.58	1.89 ± 0.44

Wnioski

Zarówno elektroprzędzenie, jak i liofilizacja to metody bardzo przydatne w otrzymywaniu podłoży i membran dla inżynierii tkankowej. Oba te procesy umożliwiają otrzymanie materiałów o kontrolowanych właściwościach mikrostrukturalnych i mechanicznych. W metodzie elektroprzędzenia istnieje możliwość modyfikacji szeregu parametrów, dzięki czemu można uzyskać włókna o pożądanej morfologii, liofilizacja natomiast pozwala na otrzymanie materiałów o różnej porowatości i rozmiarze porów. Różnice w mikrostrukturze i porowatości przekładają się na różnice w parametrach mechanicznych materiałów. Użycie w procesie liofilizacji roztworów polimerów o niższym stężeniu skutkuje uzyskaniem podłoży o większej porowatości i jednocześnie słabszych właściwościach mechanicznych.

Znaczący wpływ na właściwości mechaniczne ma także forma podłoży nanowłóknistych. Podłoża w kształcie rurek cechują się lepszymi parametrami mechanicznymi niż te w kształcie płaskich mat. Dodatkowy wzrost wytrzymałości uzyskano poprzez owinięcie rurek włóknami alginianowymi.

Połączenie metod elektroprzędzenia i liofilizacji prowadzi do wytworzenia asymetrycznych podłoży PLAel/PCL40, które posiadają znacznie lepsze właściwości mechaniczne w porównaniu do poszczególnych faz składowych. Jest to wynikiem wytworzenia warstwy pośredniej pomiędzy fazą włóknistą z polilaktydu i porowatą z polikaprolaktonu - częściowa impregnacja nanowłókien zmniejsza ich odkształcalność i zwiększa wytrzymałość całego układu.

W procesie elektroprzędzenia uzyskano włókniny i rurki o wysokiej odkształcalności mogące znaleźć zastosowanie na podłoża do regeneracji naczyń krwionośnych. Zastosowanie metody liofilizacji pozwoliło na zwiększenie wytrzymałości mechanicznej i modułu Younga oraz uzyskanie materiału o wysokiej porowatości i znacznie większym rozmiarze porów, czyli otrzymano podłoża bardziej nadające się do regeneracji np. tkanki kostnej. Wykorzystanie techniki łączącej elektroprzędzenie i liofilizację pozwoliło na wytworzenie materiałów o asymetrycznej mikrostrukturze, nadających się np. na membrany do sterowanej regeneracji kości.

Podziękowania

Praca była finansowana z badań statutowych nr 11.11.160.256 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Conclusions

Both electrospinning and freeze-drying are useful methods for fabrication of tissue engineering scaffolds and membranes. They both enable obtaining materials with controlled microstructural and mechanical properties. It is possible to modify a number of parameters with electrospinning method and thus to obtain fibers with desired morphology, while freeze-drying is helpful in formulating materials with different porosity and pore size. Differences in microstructure and porosity are reflected in different mechanical properties of the materials. Use of lower polymer solution concentrations in freeze-drying process leads to formation of scaffolds with higher porosity but lower mechanical properties.

The shape of nonwoven scaffolds also had a significant influence on mechanical properties. Tube-shaped scaffolds have higher mechanical properties than those in the shape of flat mats. Additional increase in mechanical strength has been achieved by wrapping the tubes in alginate fibers.

Combining the method of electrospinning and freeze-drying leads to fabrication of asymmetrical PLAel/PCL40 scaffolds with better mechanical properties in comparison to its individual constituent phases. It is a result of an inter-phase creation between fibrous polylactide and porous polycaprolactone phase - partial impregnation of nanofibers decreased their deformability and increased strength of the whole structure.

Nonwovens and tubes with high deformability suitable for vascular engineering scaffolds were obtained through electrospinning. It was possible to improve the values of mechanical strength and Young's modulus as well as fabricate highly porous scaffolds with bigger pores suitable for bone tissue regeneration by using freeze-drying. Combination of the two methods allowed for formulation of membranes with asymmetrical structure suitable for guided bone regeneration.

Acknowledgments

This work was financed by statutory research 11.11.160.256 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

Piśmiennictwo

References

- [1] O'Brien F.J.: Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14(3) (2011) 88-95.
- [2] Chan B.P., Leong K.W.: Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 17(4) (2008) 467-479.
- [3] Lu T., Li Y., Chen T.: Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine* 8 (2013) 337-350.
- [4] Sill T.J., Recum H.A.: Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29(13) (2008) 1989-2006.
- [5] Lannutti J., Reneker D., Ma T., Tomasko D., Farson D.: Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 27(3) (2007) 504-509.
- [6] Sultana N., Wang M.: PHBV/PLLA-based composite scaffolds fabricated using an emulsion freezing/freeze-drying technique for bone tissue engineering: surface modification and in vitro biological evaluation. *Biofabrication* 4 (2012) 015003.

OCENA STABILNOŚCI TERMICZNEJ PROSZKÓW ZrO_2 MODYFIKOWANYCH TLENKAMI MgO ORAZ Y_2O_3

DAMIAN NAKONIECZNY*, ZBIGNIEW PASZENDA, WITOLD WALKE

POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH, UL. GENERAŁA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 41-800 ZABRZE

* E-MAIL: DAMIAN.NAKONIECZNY@POLSL.PL

Streszczenie

Celem zrealizowanych badań było uzyskanie proszków ZrO_2 , zmodyfikowanych tlenkami itru i magnezu, które mogłyby być wykorzystane do przygotowania bloczków ceramicznych - półproduktu w procesie wytwarzania tzw. pełnoceramicznych protez stałych w protetyce stomatologicznej. Uzupełnienia pełnoceramiczne (full-ceramic restorations) w porównaniu do konwencjonalnych protez metalowo-ceramicznych (porcelain fused to metal) nie powodują metalozu oraz nie sprzyjają odkładaniu się płytki nazębnej i kamienia nazębnego. Rosnąca popularność protez pełnoceramicznych jest wynikiem upowszechnienia się technologii CAD/CAM, (wprowadzenie bardzo dokładnych frezarek numerycznych oraz oprogramowania dedykowanego dla gabinetów i laboratoriów stomatologicznych), dzięki której można precyzyjnie odwzorować warunki anatomiczne panujące w jamie ustnej pacjenta oraz wykonać funkcjonalne uzupełnienia protetyczne. Etapem limitującym dalsze stadia procesu wytwórczego oraz właściwości eksploatacyjne ZrO_2 jest synteza proszków ceramicznych. Do przygotowania proszków wykorzystano „klasyczną” mokrą metodę zol-żel. Jako prekursor tlenku cyrkonu zastosowano propanolan cyrkonu. Jako prekursor domieszek tlenkowych wykorzystano heksahydraty azotanu itru oraz magnezu. Przydatność przygotowanych do prac proszków oceniono na podstawie analizy termicznej z wykorzystaniem termogravimetrii (TG). Materiały poddano badaniom ze względu na prawdopodobieństwo wystąpienia w składzie chemicznym sporządzonych próbek termolabilnego w zakresie temperatur spiekania wodorotlenku cyrkonu ($Zr(OH)_4$, temperatura rozkładu 823 K) [1]. Przeprowadzona analiza pozwoliła stwierdzić nieznaczny, nie związany z dehydracją ubytek masy próbek, co świadczy o braku obecności wodorotlenku cyrkonu w przygotowanych proszkach.

Słowa kluczowe: zol-żel, biomateriały ceramiczne, protetyka stomatologiczna, CAD/CAM

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 8-12]

Wprowadzenie

Tlenek cyrkonu jest materiałem charakteryzującym się dużą twardością, odpornością na zużycie cieerne, obojętnością chemiczną, wysoką temperaturą topnienia oraz niskim współczynnikiem przewodzenia ciepła. Z tego też względu znalazł zastosowanie m. in. jako warstwa żaroodporne (TBC), pokrycie szybkoobrotowych narzędzi tnących, łożyska kulkowe oraz elementy endoprotez stawowych [1-3].

EVALUATION OF THERMAL STABILITY OF ZrO_2 POWDERS MODIFIED WITH MgO AND Y_2O_3

DAMIAN NAKONIECZNY*, ZBIGNIEW PASZENDA, WITOLD WALKE

FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES ENGINEERING, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. CHARLESA DE GAULLE'A 66, 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: DAMIAN.NAKONIECZNY@POLSL.PL

Abstract

The aim of presented study was to obtain zirconia powders modified with magnesium and yttrium oxides addition, which could be used for the preparation of the ceramic blocks – an intermediate product for manufacturing of the full ceramic fixed prosthetic restorations in prosthetic dentistry. Full ceramic restorations compared to so called conventional porcelain fused to metal restorations do not cause metallosis and prevent to the accumulation of plaque and tartar. The growing popularity of all-ceramic restorations is the result of spread of CAD / CAM technology, (introduction of high-precision milling machines and dedicated software for dentist and technicians laboratories) which allows to precisely reproduce the anatomical conditions prevailing in the patient's mouth and perform functional prosthetic restorations. Limiting step of the further process stages is the synthesis of ceramic powders. For the preparation of the ceramic powders the "classic" wet sol-gel method was used. As the zirconium oxide precursor zirconium isopropoxide was used. As the dopant oxide precursors were used yttrium and magnesium nitrate hexahydrates. Usefulness of prepared powders was characterized by thermogravimetry (TG). Materials were tested due to the likelihood occurrence of zirconium hydroxide in prepared samples chemical composition which is thermolabile in the range of sintering temperatures ($Zr(OH)_4$, decomposition temperature 823 K) [1]. Results of the analysis led to the conclusion of presence of negligible, not associated with dehydration weight loss of the samples which show the absence of zirconium hydroxide in prepared powders.

Keywords: sol-gel, ceramic biomaterials, prosthetic dentistry, CAD/CAM

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 8-12]

Introduction

Zirconium oxide is material characterized by: high toughness, wear resistance, chemical inertness, high melting point and low thermal conductivity coefficient. For these reasons it has been applied as: thermal barrier coating (TBC), high-speed cutting tools covering, ball bearings and elements of joint prostheses [1-3]. The white color of ZrO_2 pointed out attention of dentists which are looking for high strength material with low heat capacity and high esthetic values which allow to obtain esthetic fixed prosthetic restorations (FPR, crowns and bridges) free from porcelain-fused-to-metal restorations (PFM) drawbacks (metallosis, metal translucence via veneering). Zirconia oxide exists in three allotropic forms: monoclinic, tetragonal and cubic.

Biała barwa ZrO_2 zwróciła uwagę środowiska stomatologicznego poszukującego wytrzymałego materiału o niskiej pojemności cieplnej i korzystnych walorach estetycznych, z którego wykonywałyby się estetyczne protezy stałe (korony, mosty) pozbawione wad uzupełnień metaloceramicznych (metalozą, przeświecanie metalu przez licowanie ceramiczne). Tlenek cyrkonu występuje w trzech odmianach alotropowych: jednoskośnej, tetragonalnej i regularnej. Odmiana jednoskośna jako jedyna wykazuje stabilność w temperaturze pokojowej. Występowanie pozostałych odmian metastabilnych jest warunkowane udziałem związków stabilizujących takich jak: CaO , Y_2O_3 , CeO_2 , MgO i Al_2O_3 . [3,4-7]. Przejście fazowe pomiędzy formą stabilną a metastabilną ma charakter przemiany martenszytycznej, skutkującej wzrostem objętości ziarn ZrO_2 o ok. 4%. Efekt ten może doprowadzić do zniszczenia przedmiotów wykonanych z tlenku cyrkonu. Sposobem na kontrolowanie przemiany fazowej jest domieszkowanie ceramiki cyrkonowej wymienionymi wyżej związkami. Najchętniej stosowanym dodatkiem stabilizującym jest Y_2O_3 w ilości 3-6% (molowo) [1-6,8]. Zastosowanie dodatków stabilizujących nie rozwiązuje jednak w pełni kwestii stabilności protez stałych z ZrO_2 w środowisku jamy ustnej. Dowiedziono bowiem, że uzupełnienia ceramiczne z tlenku cyrkonu ulegają w roztworze śliny i podwyższonej temperaturze tzw. degradacji niskotemperaturowej, na którą istotny wpływ wywierają również cykliczne obciążenia wywierane w trakcie kontaktów zębowych oraz obróbka mechaniczna (wykonywana z użyciem frezarek numerycznych w technologii CAD/CAM) i ciepła w laboratorium techniczno-dentystycznym [1-6,9]. Zmniejszenie podatności ZrO_2 na ten proces można uzyskać poprzez dobór odpowiedniego dodatku stabilizującego oraz jego homogeniczną dyspersję w matrycy. Czynnikiem znacznie wpływającym na pogorszenie właściwości eksploatacyjnych protez stałych z ZrO_2 jest porowatość. Stwarza ona możliwość penetracji przestrzeni międzyziarnowych przez wilgoć. Nagromadzona ciecz generuje naprężania, które również mogą stać się powodem niekontrolowanej przemiany martenszytycznej [2,3]. Istotne jest również ścisłe przestrzeganie procesu technologicznego wytwarzania blozków ceramicznych, z których są frezowane protezy, a zwłaszcza kontrolowanie rozmiaru ziarna podczas obróbki termicznej. Istnieje pewien krytyczny zakres rozmiaru ziarna, powyżej którego następuje spontaniczna przemiana martenszytyczna [2,3,10].

Zasadniczym celem zrealizowanej pracy była ocena wpływu dodatków MgO , Y_2O_3 oraz procesu wytwarzania proszków ceramicznych na stabilność termiczną ZrO_2 . Do wytworzenia proszków wykorzystano metodę zol-żel, która umożliwia w sposób ekonomiczny otrzymanie produktów o ściśle określonym składzie chemicznym charakteryzującym się dużą homogenicznością [11-13].

Materiały i metody

Synteza metodą zol-żel

W procesie syntezy proszku wykorzystano prekursor ZrO_2 – 70% roztwór propanolanu cyrkonu w 1-propanolu ($Zr(OPr)_4$) (SIGMAALDRICH). Jako katalizator zastosowano 65% HNO_3 (POCH), jako rozpuszczalnik 2-propanol (POCH), jako prekursor tlenków metali 0,5 M roztwór $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (SIGMA ALDRICH) w 2-propanolu ($Mg(NO_3)_2PrOH$) oraz 0,5 M roztwór $Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (SIGMA ALDRICH) w 2-propanolu ($Y(NO_3)_3PrOH$) oraz wodę destylowaną. Zmienne procesowe zostały dobrane na podstawie danych literaturowych [14-18]. Reakcja była prowadzona w temperaturze pokojowej bez udziału atmosfery gazu inertnego.

Monoclinic phase is the only one stable in ambient conditions. Presence of other metastable phases is subjected to addition of stabilizing agents such as: CaO , Y_2O_3 , CeO_2 , MgO and Al_2O_3 [3,4-7]. Phase transformation between stable and metastable phases is a martensitic transformation, which consequences is 4% rise of grain volume. This effect can lead to the destruction of the objects made of zirconium oxide. Way to control phase transformation is doping zirconium ceramics with compounds mentioned above. Most popular stabilizer is Y_2O_3 in amount of 3-6% mole [1-6,8]. Use of stabilizers does not solve fully issue of stability of FPR made of ZrO_2 in human mouth environment. It has been proved that the zirconium FPR in a saliva and increased temperatures subject the low thermal degradation (LTD), which significantly affected by the cyclic loads during the tooth contacts and thermo-mechanical treatment (performed with numerical machines in the CAD/CAM technology) in dental technology laboratory [1-6,9]. Reductions of susceptibility to LTD can be achieved by the appropriate choice of the stabilizer and its homogeneous dispersion in the material matrix. A factor that significantly influences to the deterioration of ZrO_2 FPR performance is porosity. Pores allow to intergranular penetration by moisture. Accumulated liquid generates tension, which may give rise to uncontrolled martensitic transformation [2,3]. It is also important to abide strictly ceramic blocks manufacturing process, which are processed to prostheses, and especially particular control of the grain size during the heat treatment. There is a range of critical grain size above which the spontaneous martensitic transformation occurs [2,3,10].

The main objective of the realized study was the evaluation of MgO , Y_2O_3 dopants effect and ceramic powders synthesis process to the thermal stability of ZrO_2 . Powders were prepared by sol-gel method which, allow to obtain in economical way highly homogeneous products with well-defined chemical composition [11-13].

Materials and methods

Sol-gel synthesis

The zirconium powders was prepared by sol-gel method using 70% zirconium n-propoxide solution in 1-propanol ($Zr(OPr)_4$) (SIGMAALDRICH). As a catalyst nitric acid (65% POCH) was used. Rest of reagents were: as a solvent 2-propanol (POCH), oxide precursors was 0.5 M solutions of $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (SIGMA ALDRICH) and $Y(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (SIGMA ALDRICH) diluted in 2-propanol ($Mg(NO_3)_2PrOH$ and $Y(NO_3)_3PrOH$) and deionized water. Process parameters were chosen based on scientific data [14-18]. Reaction was conducted in ambient conditions without a inert gas atmosphere. Firstly to the reaction vessel $Zr(OPr)_4$ was added, after stabilization speed of magnetic stirrer (CAT ECM 6) nitric acid and 2-propanol was added. When the clear transparent solution was obtained precursor solutions was added. Next deionized water was added. After 15 minutes of stirring in entire volume homogeneous, transparent, white gel was obtained, which subsequently was mechanically fragmented. According to the procedure described above three types of powders with different molar ratio of MgO were prepared. Chemical composition of powders is shown in TABLE 1. Molar ratios: $Zr(OPr)_4$: HNO_3 : 2-propanol : H_2O were 1:1:5:2.5. In the block diagram (FIG. 1) the successive stages of laboratory work is shown.

TABELA 1. Skład chemiczny badanych proszków.
TABLE 1. Chemical composition of powders.

Proszek / Powder		1	2	3
Skład Composition [% mol]	ZrO ₂	96	94	92
	MgO	2	4	6
	Y ₂ O ₃	2	2	2

Do naczynia reakcyjnego wprowadzano propanolan cyrkonu, a po ustabilizowaniu się obrotów mieszadła magnetycznego (CAT ECM 6), dodawano kwas azotowy oraz 2-propanol. Po uzyskaniu klarownego roztworu dodawano kolejno roztwory heksahydratu azotanu itru oraz heksahydratu azotanu magnezu. Następnie do zlewki dodawano wodę destylowaną. Po 15 minutach mieszania uzyskano jednorodny, transparentny, biały żel, który w dalszej kolejności rozdrobniono mechanicznie. Według opisanej procedury sporządzono trzy rodzaje proszków różniących się stężeniem molowym MgO. Wykorzystane w badaniach składy proszków przedstawiono w TABELI 1. Stosunki molowe Zr(OPr)₄ : HNO₃ : 2-propanol : H₂O wyniosły 1:1:5:2.5. Na schemacie blokowym (RYS. 1.) przedstawiono kolejne etapy prac laboratoryjnych.

Przygotowanie proszku i suszenie

Rozdrobnione mechanicznie żele poddawano procesowi suszenia w temperaturze $T = 338$ K przez okres $t = 24$ h w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza (BINDER FED). W dalszej kolejności proszki przemywano wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości HNO₃. Placki filtracyjne suszono w temperaturze pokojowej przez okres 10 dni. Tak wysuszone próbki rozcierano następnie ręcznie w moździerzu.

Badania stabilności termicznej

Dla oceny stabilności termicznej otrzymanych materiałów wykorzystano derywatograf MOM Q-1500 D. Analizę prowadzono w następujących warunkach:

- atmosfera pieca – statyczne powietrze,
- temperatura końcowa – $T = 1123$ K,
- szybkość nagrzewania – $q = 0,17$ Ks⁻¹,
- czułość wagi (TG) – 500 mg,
- substancja odniesienia – Al₂O₃.

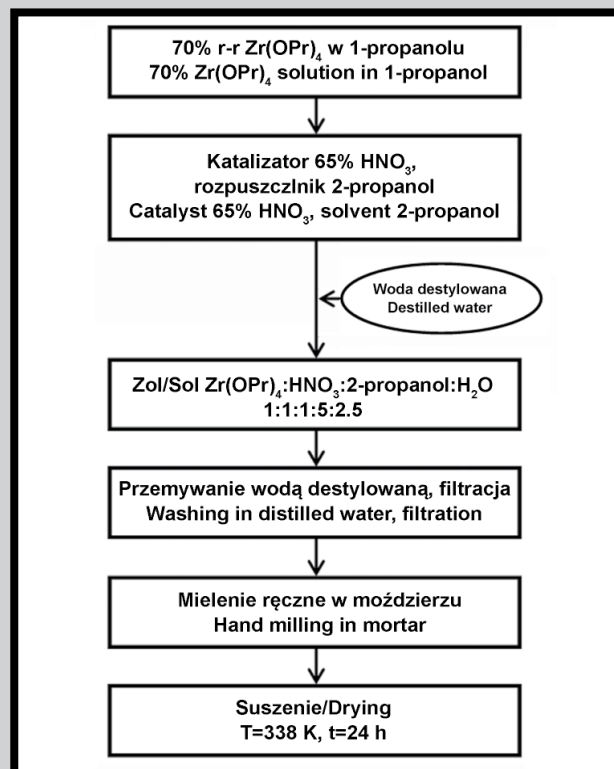
Wyniki i dyskusja

Synteza zol-żel

W trakcie prowadzenia syntezy sprawdzono kilka wariantów kolejności dodawania reagentów do naczynia reakcyjnego. Określono również wpływ stosunków molowych na strukturę żelu. Najbardziej jednolite, transparentne żele o białej barwie otrzymano w wyniku dodawania poszczególnych składników w następującej kolejności: Zr(OPr)₄ + HNO₃ + 2-propanol + Y(NO₃)₃PrOH + Mg(NO₃)₂PrOH + woda destylowana (TABELA 2). Czynnikiem, który wymagał ścisłej kontroli była lepkość mieszaniny reakcyjnej.

Przygotowanie proszku i suszenie

Na podstawie danych literaturowych dobrano temperaturę suszenia żelu $T_s = 373$ K [15]. Informacje zawarte w publikacji dotyczyły cienkich warstw naniesionych metodą wirową na powierzchnię szklanego dysku o średnicy 250 mm. Autorzy podają jedną godzinę jako czas wystarczający do całkowitego wysuszenia warstwy. Ze względu na większą objętość materiału w pracach własnych czas przebywania w suszarce zwiększono do ośmiu godzin. W wyniku suszenia przy zadanych parametrach otrzymano zróżnicowane wyniki odbiegające od oczekiwań.



RYS. 1. Otrzymywanie zmodyfikowanych proszków ZrO₂.

FIG. 1. Preparation scheme used for obtaining modified ZrO₂ powders.

Powder preparation and drying

Mechanically fragmented gels were dried at $T = 338$ K for $t = 24$ h in forced-air dryer (BINDER FED). In next step powders were washed with deionized water to remove remains of nitric acid. Filtration cakes were dried in ambient temperature for 10 days. Dried samples were grinded manually in porcelain mortar.

Thermal stability investigation

For the evaluation of the thermal stability of the materials MOM Q-1500 D derivatograph was used. The analysis was conducted under following conditions:

- furnace atmosphere - static air,
- final temperature - $T = 1123$ K,
- heating rate - $q = 0.17$ Ks⁻¹,
- sensitivity of the balance (TG) – 500 mg,
- reference substance – Al₂O₃.

Results and Discussion

Sol-gel synthesis

In the course of synthesis several variants of reagent addition to the reaction vessel were tested. Also influence of molar ratios to the gel structure was specified. The most homogeneous, transparent white gels were obtained by adding the reactants in following order: Zr(OPr)₄ + HNO₃ + 2-propanol + Y(NO₃)₃PrOH + Mg(NO₃)₂PrOH + deionized water (TABLE 2). Factor, which required strict control, was the mixture viscosity.

Powder preparation and drying

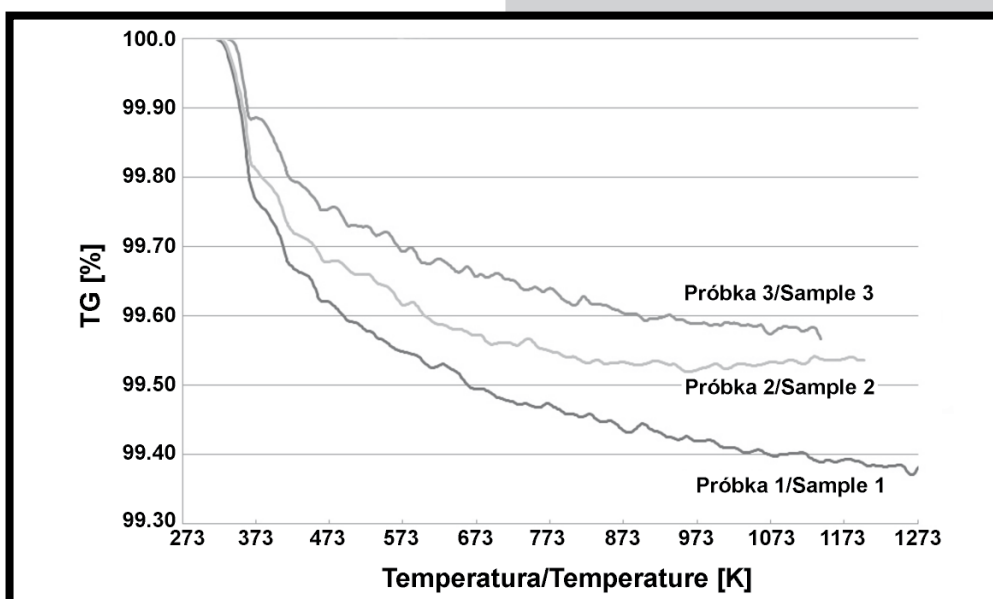
Based on scientific data the gel drying temperature was chosen $T_s = 373$ K [15]. Information concerned the deposition of thin films with spin coating method to the surface of glass disc with 250 mm diameter. The authors indicate that one-hour period of time sufficient to dry the layer.

TABELA 2. Parametry procesu syntezy badanych proszków.
TABLE 2. Evaluated powders synthesis process parameters.

Reakcja Reaction	Czas Time [min]	Punkt żelowania Gelation point [min]	Ogrzewanie Heating [323 K]	Stosunek Zr(OPr) ₄ :H ₂ O Ratio Zr(OPr) ₄ :H ₂ O	Struktura żelu Gel structure
1	100	100	-	1:5	niejednorodna / inhomogeneous
2	28	28	-	1:5	niejednorodna / inhomogeneous
3	36	25	-	1:5	niejednorodna / inhomogeneous
4	20	15	-	1:5	niejednorodna / inhomogeneous
5	35	30	-	1:5	niejednorodna / inhomogeneous
6	32	29	-	1:1.25	niejednorodna / inhomogeneous
7	30	25	-	1:1.25	niejednorodna / inhomogeneous
8	30	26	-	1:1.25	niejednorodna / inhomogeneous
9	43	30	-	1:1.25	niejednorodna / inhomogeneous
10	28	25	-	1:2.5	jednolita / homogeneous
11	25	23	Tak/Yes	1:2.5	jednolita / homogeneous
12	24	21	Tak/Yes	1:2.5	jednolita / homogeneous
13	25	23	Tak/Yes	1:2.5	jednolita / homogeneous

TABELA 3. Wpływ temperatury i czasu suszenia na strukturę próbki.
TABLE 3. Effect of temperature and drying time on the sample structure.

Reakcja Reaction	Czas Time [min]	Temperatura Temperature [K]	Struktura Structure	Barwa Color
1	480	373	pył / powder	biała / white
2	480	373	drobne kryształy / minor crystals	biała / white
3	480	373	drobne kryształy / minor crystals	kremowa / cream
4	480	373	drobne kryształy / minor crystals	żółta / yellow
5	480	373	pył / powder	szara / gray
6	420	373	pył / powder	jasnoszara / lightly gray
7	420	373	drobne kryształy / minor crystals	kremowa / cream
8	360	373	pył / powder	czarna / black
9	360	373	pył / powder	szara / gray
10	60	373	pył / powder	szara / gray
11	60	373	aglomeraty / agglomerate	biała / white
12	60	363	aglomeraty / agglomerate	biała / white
13	1440	338	aglomeraty / agglomerate	biała / white



RYS. 2. Krzywe TG: próbka 1 (4% MgO), próbka 2 (2% MgO), próbka 3 (6% MgO).
FIG. 2. TG curves: sample 1 (4% MgO), sample 2 (2% MgO), sample 3 (6% MgO).

Analizując kolejne źródło literaturowe [16] i ściśle kontrolując strukturę materiału w trakcie suszenia (krok czasowy 15 min.) dobrano optymalne parametry. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w TABELI 3.

Wysuszone proszki przemyto trzykrotnie wodą destyloowaną oraz sączono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano trzy jednolite placki filtracyjne.

Badania stabilności termicznej

Wyniki badań stabilności termicznej wytworzonych proszków przedstawiono na RYS. 2.

Na podstawie analizy krzywych TG można stwierdzić nieznaczny ubytek masy badanych próbek: próbka 1 – 0.62%, próbka 2 – 0.46%, próbka 3 – 0.44%. W przypadku próbki 1 w zakresie wyższych temperatur można zauważyć większą tendencję spadkową masy. Niemniej w badanym zakresie temperatur nie ma zmian świadczących o dehydratacji.

Wnioski

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań dotyczące przydatności metody zol-żel do wytwarzania proszku ZrO_2 modyfikowanego MgO oraz Y_2O_3 z przeznaczeniem do zastosowań w protetyce stomatologicznej. Przeprowadzona analiza termogravimetryczna potwierdziła brak w składzie chemicznym przygotowanych proszków wodorotlenku cyrkonu. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają celowość zastosowania metody zol-żel do wytwarzania biomateriałów ceramicznych.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować dr inż. Tomaszowi Radko z Katedry Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach za pomoc w interpretacji uzyskanych wyników. Koszty badań zostały pokryte ze środków własnych Katedry Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych.

Due to the larger volume of the dried material in our work drying time was increased to eight hours. Results of drying with given parameters differ from expectations. Analysis of another data and strict control of material structure during drying allow to choose optimal parameters [16]. Results are shown in TABLE 3.

Dried powders were three times washed with deionized water under low-pressure. Three homogeneous filtration cakes were obtained.

Thermal stability investigation

The results of thermal stability of prepared powders are shown in FIG. 2.

Based on the TG curves it can be observed a slight loss of mass of the samples: 1 – 0.62%, 2 – 0.46% and 3 – 0.44%. In the case of sample 1 in the higher range of temperatures there is a tendency of higher mass decrease. However, in a considered range of temperatures there is no change in mass due to dehydration.

Conclusions

In the paper preliminary results of suitability of the sol-gel process for the production of modified with MgO and Y_2O_3 zirconium oxide powder which may be intended for prosthetic dentistry are presented. Thermogravimetric analysis of prepared powders confirmed the absence of zirconium hydroxide in the powders. Obtained results confirm the usefulness of the sol-gel process for the manufacturing of ceramic biomaterials.

Podziękowania

The authors would like to thank Dr.-Ing. Tomasz Radko from the Department of Inorganic Chemistry, Analytical Chemistry and Electrochemistry, Faculty of Chemistry, Silesian University of Technology for their help in the interpretation of the obtained results. Research costs were covered by the own Department of Biomaterials and Medical Devices Engineering.

Piśmiennictwo

- [1] Abraham G., Seena P.T.: Thermal studies on zirconium hydroxide gel formed by aqueous gelation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 110 (2012) 1037-1041.
- [2] Piconi C., Maccauro G.: Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials* 20 (1999) 1-25.
- [3] Chevalier J., Gremillard L., Vikar A.V., Clarke D.R.: The Tetragonal-Monoclinic Transformation in Zirconia: Lessons Learned and Future Trends. *Journal of American Ceramic Society* 92 (9) (2009) 1901-1920.
- [4] Hannink R.H.J., Kelly P.M., Muddle B.C.: Transformation Toughening in Zirconia-Containing Ceramics. *Journal of American Ceramic Society* 83 (3) (2000) 461-487.
- [5] Kelly J.R., Denry I.: Stabilized zirconia as a structural ceramic: An overview. *Dental Materials* 24 (2008) 289-298.
- [6] Zarone Z., Russo S., Sorrentino R.: From porcelain-fused-to-metal to zirconia: clinical and experimental considerations. *Dental Materials* 27 (2011) 83-96.
- [7] Lugh V., Sergio V.: Low temperature degradation – aging of zirconia: A critical review of the relevant aspects in dentistry. *Dental Materials* 26 (2010) 807-820.
- [8] Lebrun N., Perrot P.: The Landolt-Börnstein – Group IV Physical Chemistry Numerical Data and Functional Relationships in Science and Technology 11 (E3) (2010) 87-109.
- [9] ISO 13356: 2008, Implants for surgery – Ceramic materials based on yttria-stabilized tetragonal zirconia (Y-TZP).
- [10] Chevalier J.: What future for zirconia as a biomaterial? *Biomaterials* 27 (2006) 535-543.

References

- [11] Denry I., Kelly J.R.: State of the art of zirconia for dental applications. *Dental Materials* 24 (2008) 299-307.
- [12] Sakka S.: *Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications*, Vol. 1 – Sol-Gel Processing, Kluwer Academic Publishers Springer New York 2004.
- [13] Corriu R., Trong Anh N.: *Molecular Chemistry of Sol-Gel Derived Nanomaterials* Wiley 2009.
- [14] Segel D.: Chemical synthesis of ceramic materials. *Journal of Materials Chemistry* 7 (8) (1997) 1297-1305.
- [15] Diaz-Parralejo A., Macias-Garcia A., Sanchez-Gonzales J., Rñgeles Diaz-Diez M., Cuerda-Correa E.M.: A novel strategy for the preparation of yttria-stabilized zirconia powders: Deposition and scratching of thin films obtained by the sol-gel method. *Journal of Non Crystal Solids* 357 (2011) 1090-1095.
- [16] Changrong X., Huaqiang C., Hong W., Pinghua Y., Guangyao M., Dingkun P.: Sol-gel synthesis of yttria stabilized zirconia membranes through controlled hydrolysis of zirconium alkoxide. *Journal of Membrane Science* 162 (1-2) (1999) 181-188.
- [17] Viazzi C., Deboni A., Ferreira J.Z., Bonino J.P., Ansart F.: Synthesis of Yttria Stabilized Zirconia by sol-gel route: Influence of experimental parameters and large scale production. *Solid State Sciences* 8 (9) (2006) 1023-1028.
- [18] Bansal N.P.: Sol-Gel synthesis of $MgO-SiO_2$ glass compositions having stable liquid-liquid immiscibility, 89th Annual meeting and Exposition of the American Ceramic Society Pittsburgh, Pennsylvania April 26-30, 1987.

MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI WARSTW TLENOAZOTOWANYCH WYTWORZONYCH W OBRÓBCE HYBRYDOWEJ W NISKOTEMPE- RATUROWEJ PLAZMIE

MICHAŁ TARNOWSKI^{1*}, AGNIESZKA SOWIŃSKA²,
JUSTYNA OLEKSIĄK³, TOMASZ BOROWSKI¹,
ELŻBIETA CZARNOWSKA², TADEUSZ WIERZCHOŃ¹

¹ WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
UL. WOŁOSKA 121, 02-507 WARSZAWA

² INSTYTUT "POMNIK" CENTRUM ZDROWIA DZIECKA,
ZAKŁAD PATOLOGII,
AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSZAWA

³ WYDZIAŁ MECHATRONIKI, POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
UL. ŚW. ANDRZEJA BOBOLI 8, 02-525 WARSZAWA

* E-MAIL: MICTARN@GMAIL.COM

Streszczenie

Szczególne właściwości tytanu i jego stopów, takie jak: niska gęstość, wysoka wytrzymałość właściwa oraz dobra odporność na korozję i korzystny moduł Younga w zestawieniu z powszechnie stosowanymi stalami chirurgicznymi na implanty kostne powodują, że znajdują one coraz szersze zastosowanie w medycynie. Obecnie jednym z rozwijanych kierunków badań w aspekcie poprawy biogodności tytanu i jego stopów jest poprawa łączenia się implantu z kością poprzez zwiększenie adhezji oraz aktywacji płytek krwi. Cel ten można osiągnąć poprzez zastosowanie technik inżynierii powierzchni, takich jak metody PVD i CVD, implantację jonów oraz obróbki jarzeniowe, np. tlenoazotowanie w niskotemperaturowej plazmie.

Celem niniejszych badań była ocena mikrostruktury (SEM), składu chemicznego (EDS), topografii powierzchni (profilometr optyczny), mikrotopografii oraz mikrochropowatości powierzchni (AFM), mikro-twardości, odporności korozyjnej w roztworze Ringera (metoda potencjodynamiczna) oraz biogodności warstw tlenoazotowanych wytworzonych podczas procesu tlenoazotowania jarzeniowego w niskotemperaturowej plazmie w temperaturze 650°C. Dyfuzyjna warstwa typu $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ wytworzona na stopie tytanu Ti6Al4V charakteryzuje się wysoką twardością, dobrą odpornością korozyjną i wyższą, niż stop tytanu w stanie wyjściowym, twardością. Badania biogodności w zakresie adhezji i aktywacji płytek krwi wykazały, że adherowały one w większym stopniu i wykazywały cechy większej aktywacji na warstwach tlenoazotowanych niż na stopie tytanu Ti6Al4V w stanie wyjściowym. Rezultaty wskazują, że wytworzenie warstwy tlenoazotowanej pozwala poprawić właściwości biomateriałów tytanowych w aspekcie integracji z kością.

Słowa kluczowe: tlenoazotowanie, warstwy powierzchniowe, mikrostruktura, topografia powierzchni, adhezja płytek krwi

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 13-18]

MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES OF OXYNITRIDED SURFACE LAYER PRODUCED UNDER HYBRID LOW TEMPERATURE PLASMA TREATMENT

MICHAŁ TARNOWSKI^{1*}, AGNIESZKA SOWIŃSKA²,
JUSTYNA OLEKSIĄK³, TOMASZ BOROWSKI¹,
ELŻBIETA CZARNOWSKA², TADEUSZ WIERZCHOŃ¹

¹ FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
UL. WOŁOSKA 121, 02-507 WARSAW, POLAND

² THE CHILDREN'S MEMORIAL HEALTH INSTITUTE,
PATHOLOGY DEPARTMENT,
AL. DZIECI POLSKICH 20, 04-730 WARSAW, POLAND

³ FACULTY OF MECHATRONICS, WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
UL. ŚW. ANDRZEJA BOBOLI 8, 02-525 WARSAW, POLAND

* E-MAIL: MICTARN@GMAIL.COM

Abstract

Specific properties of titanium and its alloys such as: low density, high tensile strength, good corrosion resistance and advantageous elastic modulus in comparison to commonly used surgical steels for bone implants are the reasons for their wider application in medicine. Nowadays, one of the most expandable directions of investigation in the aspect of enhancing biocompatibility of titanium and its alloys is improvement of platelets adhesion and activation to bone implant. This goal can be achieved through the use of several surface engineering methods like PVD and CVD methods, ion implantation and treatment in glow discharge conditions like low temperature plasma oxynitriding.

This study was aimed to evaluate the microstructure (SEM), chemical composition (EDS), topography (optical profilometer), microtopography and microroughness (AFM), microhardness, corrosion resistance in Ringer solution (potentiodynamic method) and biocompatibility of oxynitrided surface layer produced at low temperature of glow discharge process. The diffusive surface layer of $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ type produced on Ti6Al4V titanium alloy exhibited advantageous properties such as high hardness, good corrosion resistance and higher than titanium alloy microhardness. Biocompatibility investigated in range of platelets adhesion and activation revealed that these cells adhered in higher extent and displayed morphological features of larger activation on oxynitrided layer compared to titanium alloy. Results suggest that produced oxynitrided surface layer have a potential to improve titanium biomaterials in range of integration with bone.

Keywords: oxynitriding, surface layers, microstructure, platelets adhesion

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 13-18]

Proces tlenoazotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego wydaje się być jedną z bardziej perspektywicznych metod inżynierii powierzchni do wytwarzania tlenków na azotowanej powierzchni tytanu i jego stopów w aspekcie polepszenia ich biologicznego kontaktu z kością. Ten hybrydowy proces składający się z procesów azotowania i utleniania w niskotemperaturowej plazmie pozwala na wytworzenie warstw dyfuzyjnych typu $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ na detalach o skomplikowanych kształtach, w temperaturze poniżej $680^\circ C$, więc bez znaczącej zmiany w mikrostrukturze obrabianego materiału [1,2]. Tlenki tytanu polepszają biologiczne właściwości w zakresie kontaktu tytanu i jego stopów z kością (tzw. efekt biomimetyczny w roztworze fizjologicznym – SBF [3]), podczas gdy warstwa azotowana $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ eliminuje efekt metalozy [4].

Wiadome jest, że implanty tytanowe tworzą pasywną warstwę TiO_2 , która natychmiast wchodzi w kontakt z proteoglikanami tkanki włóknistej na powierzchni rozdziału kość-implant. Jednak pasywna powłoka TiO_2 ma słabe właściwości mechaniczne [5]. Dlatego tlenki tytanu wytworzone w różnych procesach obróbek powierzchniowych na stopach tytanu zostały dogłębnie przebadane w aspekcie poprawy właściwości mechanicznych, biogodności i odporności na korozję [6,7]. Ich struktura i topografia powierzchni są najważniejszymi parametrami warunkującymi adsorpcję protein, adhezję i proliferację osteoblastów oraz wzrost tkanki kostnej [8]. Stosując technologię tlenoazotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego można w łatwy sposób wytwarzać dyfuzyjne warstwy wierzchnie, które zapobiegają zjawisku metalozy, a zewnętrzna strefa tlenku tytanu TiO_2 może być modyfikowana w szerokim zakresie. Celem tej pracy była ocena właściwości i biogodności tlenoazotowanych warstw powierzchniowych wytworzonych na stopie tytanu Ti6Al4V w warunkach wyładowania jarzeniowego w niskiej temperaturze z rozwiniętą zewnętrzną strefą tlenku tytanu - TiO_2 .

Materiały i metody

Na szlifowanych próbkach ze stopu tytanu Ti6Al4V została wytworzona w warunkach wyładowania jarzeniowego warstwa tlenoazotowana. Proces tlenoazotowania składał się z dwóch etapów: azotowania w temperaturze $680^\circ C$ przez 4 godziny, a następnie utleniania w temperaturze $650^\circ C$ w czasie 20 min. Wytworzone warstwy zostały przebadane pod kątem mikrostruktury i składu chemicznego przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (Hitachi S-3500N) wyposażonego w energorozdzielczy spektrometr rentgenowski (EDS – ThermoFischer), topografii powierzchni przy użyciu skaningowego profilometru optycznego (Wyko NT9300) oraz mikroskopu sił atomowych (AFM – Veeco Multimode V) w trybie „tapping mode” i odporności korozyjnej w roztworze Ringera metodą potencjodynamiczną wykorzystując potencjostat Atlas-Solich 0531.

Próbki do badań biologicznych były sterylizowane plazmowo (Sterrad 100, atmosfera H_2O_2 , temperatura $54^\circ C$, ciśnienie 7 mbar). Badania zostały przeprowadzone przy użyciu bogato płytkowego osocza (PRP) przygotowanego z krwi zdrowych dawców, w zakresie adhezji i aktywacji płytek krwi. PRP było inkubowane w statycznych warunkach na powierzchni próbek przez 2 godziny w temperaturze $37^\circ C$. Niezaadherowane komórki zostały wypłukane. Zaadherowane komórki zostały rutynowo utrwalone, odwodnione i pokryte cienką powłoką złota do badań na skaningowym mikroskopie elektronowym (JEOL JSM-7600F).

Introduction

The oxynitriding process under glow discharge conditions seems to be one of the prospective methods of surface engineering of producing oxides on the nitrated surface of titanium and its alloys in order to improve their biological contact with bone. This hybrid process combined oxidizing followed the low temperature nitriding allows the production of $TiO_2+TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ diffusive surface layers on details of complicated shapes at the temperatures below $680^\circ C$, so without significant changes in the substrate microstructure and properties of Ti6Al4V titanium alloy [1,2]. Titanium oxides improve biological properties for better contact of titanium and its alloys with bone (so called biomimetic effect in physiological solution – SBF [3]), whereas a nitrated $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ layer, as previous examinations revealed [4], eliminates metallosis effect.

It is known that titanium implants form native TiO_2 coating which immediately goes in close contact with proteoglycans of fibrous tissue in the bone-implant interface. However, this native TiO_2 layer has poor mechanical properties [5]. Therefore, titanium oxides produced by various surface treatments on titanium alloys have been extensively investigated due their superior mechanical properties, biocompatibility and corrosion resistance [6,7]. Their structure and topography are the most important features for protein adsorption, osteoblasts adhesion and proliferation and bone tissue ingrowth [8]. Applying glow discharge oxynitriding process can be easy to produce diffusion surface layers, which protect against effect of metallosis and external zone of TiO_2 can be widely modified. The aim of this study was verification of properties and biocompatibility oxynitrided surface layer produced on Ti6Al4V alloy under glow discharge conditions at low temperature, with developed external zone of TiO_2 .

Materials and Methods

On grinded samples of Ti6Al4V alloy, under glow discharge conditions, oxynitrided surface layers were produced. The oxynitriding process consisted of two steps: nitriding at temperature of $680^\circ C$ for 4 h and then oxidizing at temp. $650^\circ C$ for 20 min. Produced layers were tested for the microstructure and chemical composition using a scanning electron microscope (Hitachi S-3500N with ThermoFischer EDS analyzer), and surface topography with scanning optical profilometer (Wyko NT9300) and atomic force microscope (AFM – Veeco Multimode V) using tapping mode, and corrosion resistance in Ringer solution by potentiodynamic method using Atlas-Solich 0531 Analyser.

Samples for biological examinations were plasma sterilized (Sterrad 100, atmosphere of H_2O_2 , temp. $54^\circ C$, pressure 7 mbar). Investigations were conducted with fresh platelet rich plasma (PRP) prepared from the blood of healthy donors in range platelets adhesion and activation. PRP was incubated in static conditions on the samples' surface by 2 h at temperature of $37^\circ C$. Not adhered cells were rinsed. Adhered cells were routinely fixed and dehydrated and covered with fine layer of gold for investigations in scanning electron microscope (Jeol JSM-7600F). Platelets number and morphology were analyzed with morphometric program Cell^{sense} (Olympus, Germany) on images taken from ten areas of each samples. Value of measurements for three samples with oxynitrided surface and three reference titanium alloy were expressed as Mean \pm SD.

Liczebność płytek krwi oraz ich morfologia były analizowane przy pomocy morfometrycznego programu Cell^{sense} (Olympus) na zdjęciach zrobionych z 10 obszarów z każdej próbki. Wartości pomiarów dla trzech próbek po tlenoazotowaniu jarzeniowym oraz 3 próbek z referencyjnego stopu tytanu Ti6Al4V zostały wyrażone w postaci wartości średniej \pm odchylenie standardowe.

Wyniki i dyskusja

Wytworzone warstwy tlenoazotowane $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ mają dyfuzyjny charakter oraz posiadają grubość około 3 μm , z zewnętrzną strefą tlenków o grubości około 300 nm (RYS. 1). Parametry chropowatości powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V w stanie wyjściowym oraz po procesie tlenoazotowania jarzeniowego otrzymane podczas badania na profilometrze optycznym przedstawia TABELA 1.

Parametry mikrochropowatości powierzchni stopu Ti6Al4V w stanie wyjściowym oraz po procesie tlenoazotowania jarzeniowego otrzymane podczas badania przy użyciu mikroskopu sił atomowych przedstawiono w TABELI 2, natomiast obrazy fazowe oraz topografię powierzchni na RYS. 2 i 3.

Obrazy fazowe uwidaczniają strukturę szlifowanego stopu tytanu Ti6Al4V (RYS. 2), która składa się z odkształconych plastycznie na skutek szlifowania faz α i β , z kolei w przypadku tlenoazotowania jarzeniowego tworzy się struktura tlenków tytanu równomiernie rozmieszczonych na powierzchni stopu. Badany stop tytanu Ti6Al4V w stanie wyjściowym charakteryzuje się dużym rozwinięciem powierzchni ze względu na fakt, iż został on wstępnie poddany szlifowaniu papierem ściernym o gradacji 240, natomiast proces tlenoazotowania powoduje wzrost parametrów chropowatości, zarówno w skali makro, jak i mikro, szlifowanej powierzchni stopu tytanu (TABELA 2, RYS. 3).

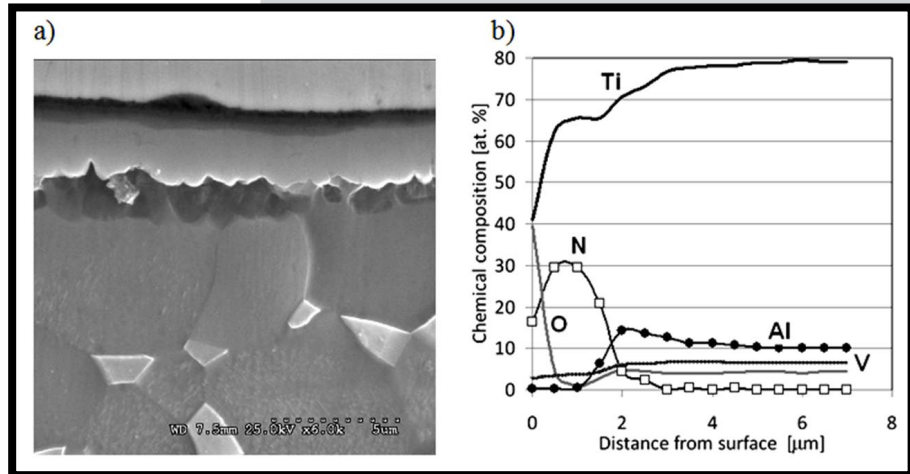
TABELA 1. Parametry chropowatości powierzchni stopu Ti6Al4V w stanie wyjściowym oraz po wytworzeniu dyfuzyjnej warstwy typu $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ w procesie tlenoazotowania jarzeniowego uzyskane przy pomocy profilometru optycznego.

TABLE 1. Surface roughness parameters of Ti6Al4V alloy in its initial state and with produced in plasma oxynitriding process diffusive layer $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ obtained with the use of optical profilometer.

Badany materiał Examined material	Parametr chropowatości Surface roughness parameters		
	Ra [μm]	Rq [μm]	Rz [μm]
Ti6Al4V	0.600	0.748	6.172
$\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$	0.733	0.914	7.420

Results and Discussions

The produced oxynitrided layers had diffusive character and were $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ type. Their thickness was about 3 μm , and external titanium oxide zone was about 300 nm (FIG. 1). Surface roughness parameters of Ti6Al4V titanium alloy in initial state and after plasma oxynitriding process obtained during optical profilometer investigations are presented in TABLE 1.



RYS. 1. Mikrostruktura (a) i skład chemiczny (b) warstwy tlenoazotowanej.
FIG. 1. Microstructure (a) and chemical composition (b) of the oxynitrided layer.

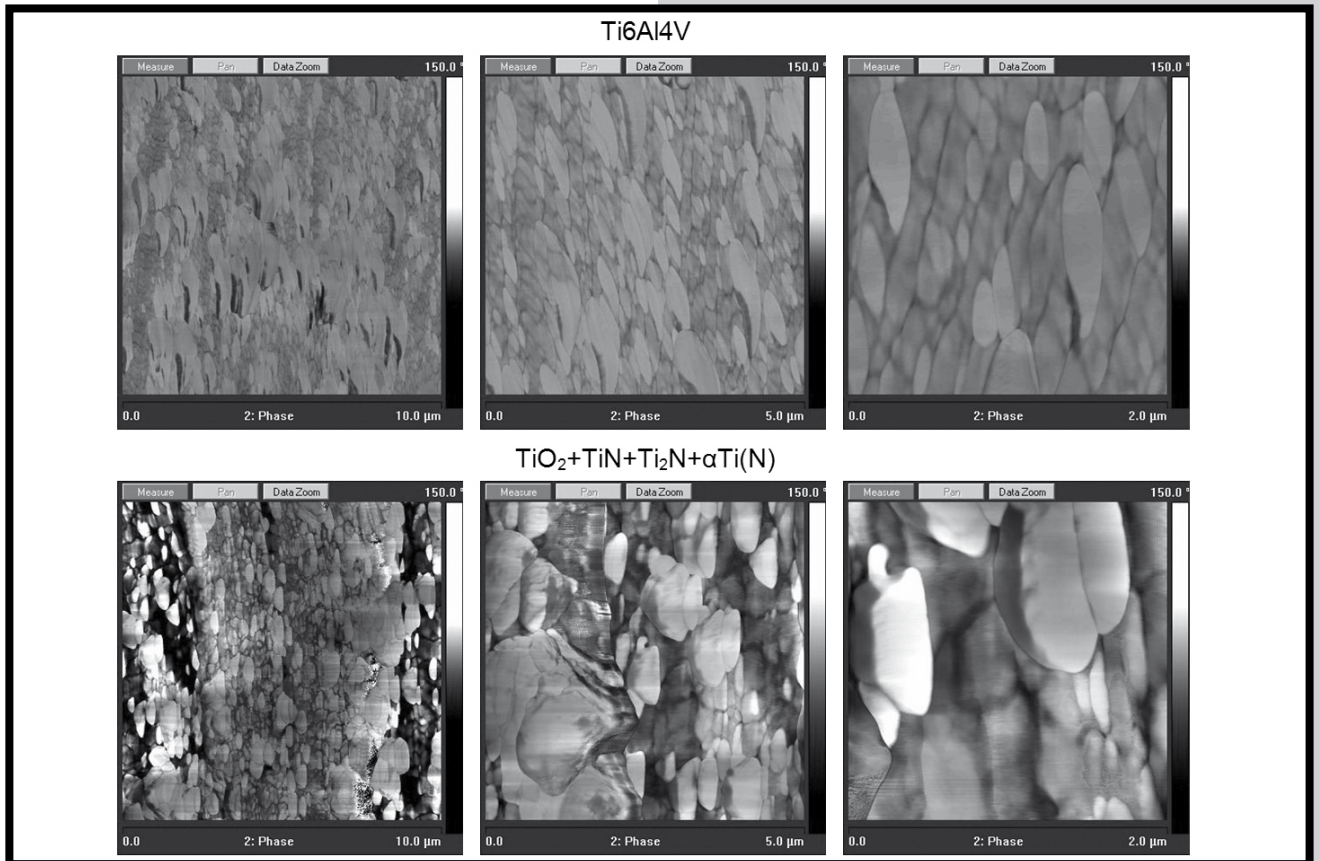
Surface roughness parameters of Ti6Al4V titanium alloy in initial state and after oxynitriding in glow discharge conditions obtained with the use of atomic force microscope are presented in TABLE 2 while phase images and surface topography are presented in FIGS 2 and 3.

Phase images show the structure of grinded Ti6Al4V titanium alloy (FIG. 2), which consists of plastically deformed – due to grinding – phases α and β . After oxynitriding in glow discharge conditions phase images show structure of titanium oxide evenly located on titanium alloy's surface. Examined Ti6Al4V titanium alloy in initial state is characterized by high surface development due to the fact, that it has been grinded with abrasive papers of 240 gradation. Oxynitriding in glow discharge conditions enhanced surface roughness parameters of grinded surface of titanium alloy in macro and micro scale (TABLE 2, FIG. 3).

TABELA 2. Parametry chropowatości powierzchni stopu Ti6Al4V w stanie wyjściowym oraz po wytworzeniu dyfuzyjnej warstwy typu $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ uzyskane przy pomocy mikroskopu sił atomowych.

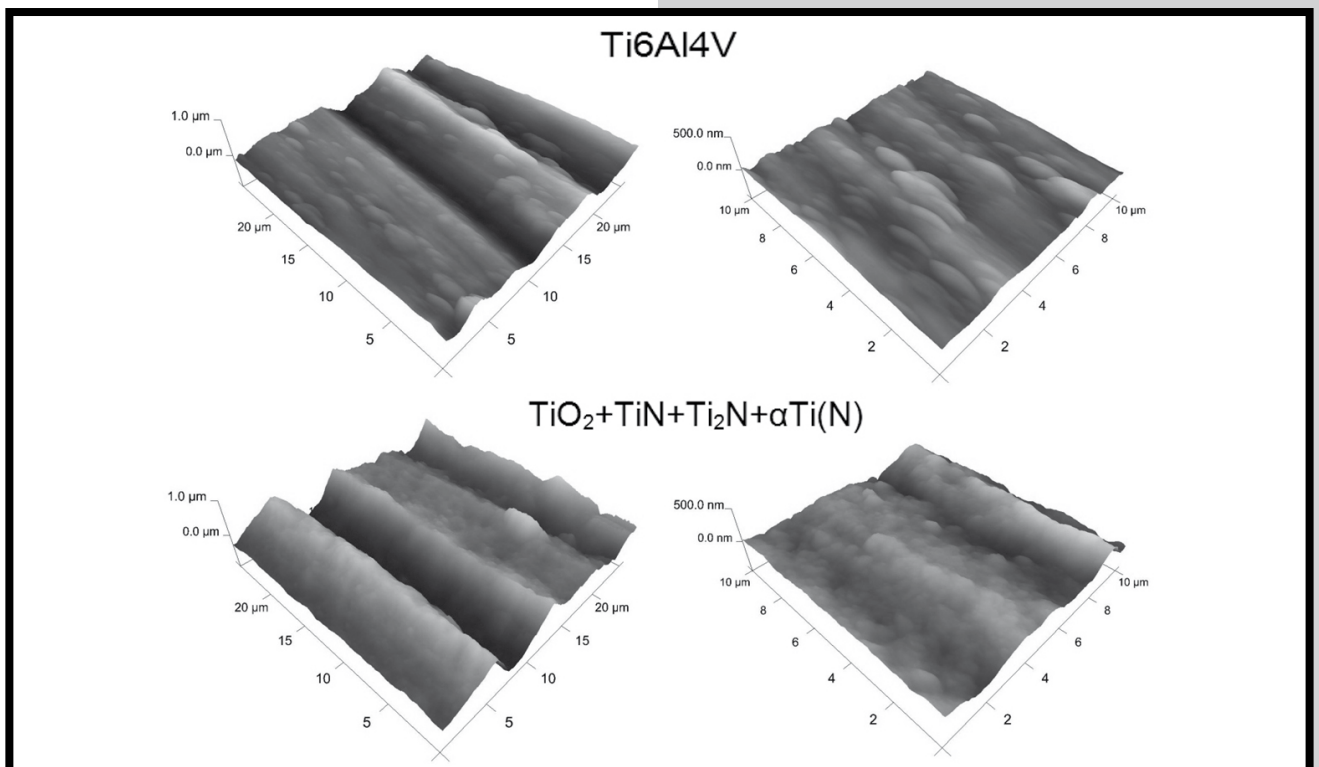
TABLE 2. Surface roughness parameters of Ti6Al4V alloy in its initial state and with produced diffusive layer $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$ obtained with the use of atomic force microscope.

Badany materiał Examined material	Parametr chropowatości Surface Roughness Parameters		
	Ra [nm]	Rq [nm]	Rz [nm]
Ti6Al4V	26.5	33.6	196
$\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti(N)}$	57.4	71.8	445



RYS. 2. Obrazy fazowe (AFM) powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V po szlifowaniu oraz warstwy $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ wytworzonej w procesie tlenoazotowania jarzeniowego.

FIG. 2. Phase images (AFM) of the surface of Ti6Al4V titanium alloy after grinding and $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ layer produced in plasma oxynitriding process.



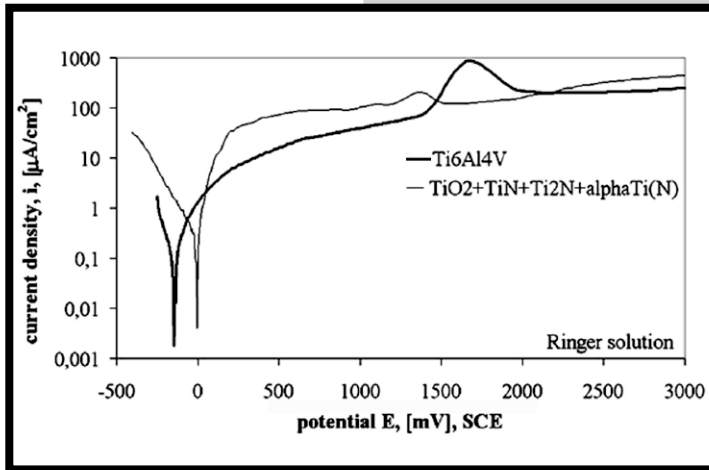
RYS. 3. Topografia powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V po szlifowaniu i warstwy typu $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ wytworzonej w procesie tlenoazotowania jarzeniowego.

FIG. 3. Surface topography of Ti6Al4V titanium alloy after grinding and $\text{TiO}_2+\text{TiN}+\text{Ti}_2\text{N}+\alpha\text{Ti}(\text{N})$ layer produced in plasma oxynitriding process.

Powierzchnia warstwy tlenoazotowanej charakteryzowała się znacznie wyższą mikrotwardością (1040 HV0,02) w porównaniu ze stopem tytanu Ti6Al4V w stanie wyjściowym (380 HV0,02) i nieco lepszą odporność korozyjną (RYS. 4).

Inkubacja próbek w PRP wykazała wyższą adhezję i agregację płytek krwi na powierzchni tlenoazotowanej w stosunku do stopu tytanu w stanie wyjściowym (RYS. 5).

Obserwacje mikroskopowe wykazały, że płytki krwi były również nieznacznie bardziej aktywowane i charakteryzowały się dendrycznym kształtem z wieloma wypustkami o większych rozmiarach (RYS. 6).



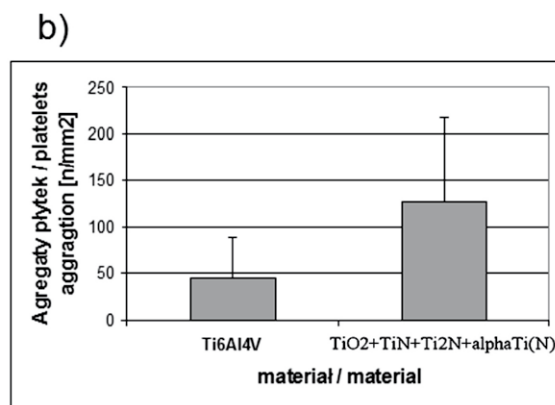
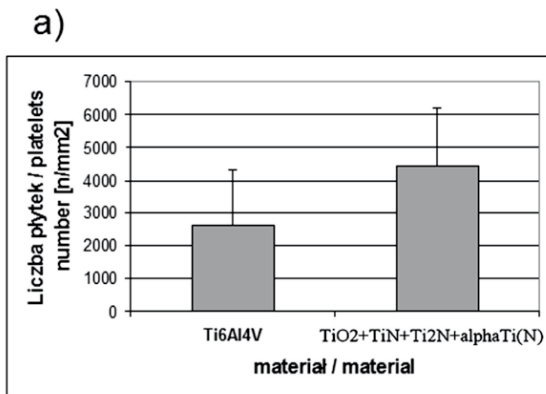
RYS. 4. Odporność korozyjna stopu Ti6Al4V w stanie wyjściowym oraz po tlenoazotowaniu jarzeniowym w temperaturze 650°C.

FIG. 4. Corrosion resistance of the Ti6Al4V alloy in initial state and oxynitrided in glow discharge conditions at 650°C.

The oxynitrided surface layer exhibited a higher microhardness (1040 HV0.02) in comparison with Ti6Al4V alloy in initial state (380 HV0.02) and slightly better corrosion resistance (FIG. 4).

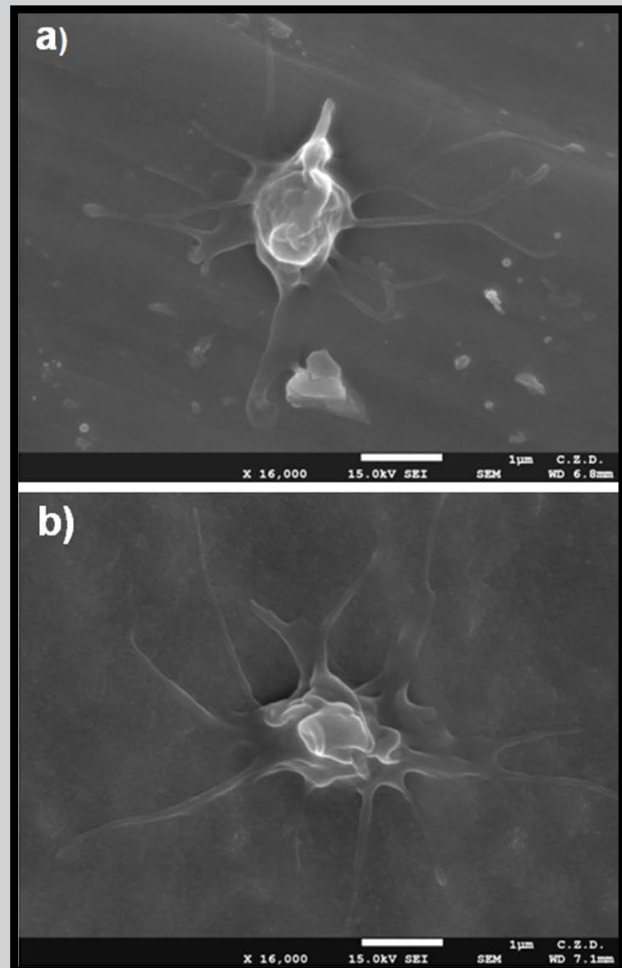
Samples incubation with PRP revealed platelets high adhesion and aggregation on oxynitrided surface layers than on titanium alloy (FIG. 5).

Imaging demonstrated that platelets were also slightly more activated exhibiting spread dendritic shape with multiple pseudopodia and larger size (FIG. 6).



RYS. 5. Adhezja (a) i agregacja płytek krwi (b) na referencyjnym stopie tytanu w stanie wyjściowym oraz warstwie tlenoazotowanej wytworzonej na stopie Ti6Al4V.

FIG. 5. Platelets adhesion (a) and aggregation (b) on reference titanium alloy in initial state and oxynitrided surface layer produced on Ti6Al4V titanium alloy.



RYS. 6. Morfologia płytek krwi zaadherowanych na referencyjnym stopie tytanu Ti6Al4V (a) i warstwie tlenoazotowanej wytworzonej na stopie Ti6Al4V (b).

FIG. 6. Morphology of platelets adhered on reference Ti6Al4V titanium alloy in initial state (a) and oxynitrided surface layer produced on Ti6Al4V alloy (b).

Analiza morfometryczna potwierdziła te obserwacje wykazując, że średni rozmiar zaadherowanych płytek krwi na powierzchni warstwy tlenoazotowanej był większy. To sugeruje, że polepszyła się interakcja pomiędzy płytkami krwi a tlenoazotowaną powierzchnią [8]. Wiadomo z danych literaturowych [9-11], że na powierzchni tlenku tytanu – TiO_2 zwiększa się adhezja komórek, oraz że większe rozwinięcie powierzchni spowodowane procesem tlenoazotowania jarzeniowego polepsza adhezję płytek krwi. Dodatkowo, zewnętrzna strefa tlenku TiO_2 gwarantuje tworzenie się fosforanów wapnia podczas ekspozycji w płynach ustrojowych, dając pozytywne efekty w aspekcie łączenia się implantu z kością [1,3].

Wnioski

- Proces tlenoazotowania jarzeniowego stopu tytanu $Ti6Al4V$ umożliwia wytworzenie tlenku tytanu – TiO_2 , w strefie zewnętrznej warstwy azotowanej $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$.
- Topografia powierzchni tlenku tytanu i zastosowana sterylizacja plazmowa wpływają na wzrost adhezji płytek krwi oraz lepsze połączenie kość-implant tytanowy.
- Wyniki badań wykazują, że warstwy tlenoazotowane mogą poprawić właściwości biomateriałów tytanowych w aspekcie integracji implantu z kością.

Podziękowania

Praca zrealizowana została w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki nr 2011/01/B/ST8/07554.

Morphometric analyses confirmed this observation showing that mean size of platelets adhered on oxynitrided surface layers was bigger. This suggest that an interaction of platelets with oxynitrided surface was increased [8]. It is known that on TiO_2 surface adhesion of cells is improved [9-11], and we also found that oxynitridation process enhances platelet adhesion. Additionally, outer TiO_2 zone guaranties the formation of calcium phosphates during exposure for body fluids, giving advantageous effect during implant bonding with bone [1,3].

Conclusions

- Glow discharge assisted oxynitriding of titanium alloy $Ti6Al4V$ enables producing of titanium oxide – TiO_2 at the external zone $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ nitrided layer.
- The roughness of TiO_2 and applied plasma sterilization influence on increase platelets adhesion and bone-titanium biomaterials interface.
- The results suggest that the oxynitrided surface layers have a potential to improve titanium biomaterials in rage of integration with bone.

Acknowledgments

The presented study was performed within the framework of research project no. 2011/01/B/ST8/07554 sponsored by Polish National Centre of Science.

Piśmiennictwo

- [1] Czarnowska E., Morgiel J., Ossowski M., Major L., Sowińska A., Wierzchoń T.: Microstructure and biocompatibility of titanium oxides produced on nitrided surface layers under glow discharge conditions. *J. of Nanoscience and Nanotechnology* 11 (2011) 8917-8923.
- [2] Tarnowski M., Garbacz H., Ossowski M., Brojanowska A., Wierzchoń T.: Modifying of $Ti6Al4V$ titanium alloy functional properties in low-temperature glow discharge nitriding process. *Kovové materiály - Metallic Materials – under review*
- [3] Kokubo T.: Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment. *Acta Materialia* 46 (1998) 2519-2517.
- [4] Czarnowska E., Wierzchoń T., Maranda A., Kaczmarewicz E.: Improvement of titanium alloy for biomedical applications by nitriding and carbonitriding process under glow discharge conditions. *J. Mater. Sci.: Mat. in Med.* 11 (2000) 73-81.
- [5] Feng B., Chen Jy, Qi S.K., He L., Zhao J.Z, Zhang X.: Characterization of surface oxide films on titanium and bioactivity. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 13(5) (2002) 457-464.

References

- [6] Liu X., Zhao X., Li Baoe, Cao C., Dong Y., Ding C., Chu P.: UV-irradiation-induced bioactivity on TiO_2 coatings with nanostructural surface. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 544-552.
- [7] Necula B.S., Fratila-Apachitei L.E., Zaat S.A.J., Apachitei I., Duszczuk J.: In vitro antibacterial activity of porous TiO_2 -Ag composite layers against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 3573-3580.
- [8] Bandyopadhyay A., Espana F., Balla V.K., Bose S., Ohgami Y., Davies N.M.: Influence of porosity on mechanical properties and in vivo response of $Ti6Al4V$ implants. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1640-1648.
- [9] Das K., Bose S., Bandyopadhyay A.: Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 573-585.
- [10] Park J.Y., Gemmel C.H., Davies J.E.: Platelets interaction with titanium: modulation of platelets activity by surface topography. *Biomaterials* 22 (2001) 2671-2682.
- [11] Davies J.E.: Mechanisms of endosseous integration. *Int. J. Prosthodont.* 11 (1998) 391-401.

MIKROGRANULE HYDROKSY- APATYTOWE POKRYWANE POLI(D,L-LAKTYDEM) JAKO IMPLANT KOSTNY I NOŚNIK ANTYBIOTYKU

AGNIESZKA JELONEK^{1*}, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA¹,
PAWEŁ MYCIŃSKI², JOANNA ZARZECKA²

¹ ZAKŁAD KRYSZALOCHEMII I KRYSZALOFIZYKI,
WYDZIAŁ CHEMII UNIwersYTETU JagIELLOŃSKIEGO,
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW

² ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ Z ENDODONCJĄ,
INSTYTUT STOMATOLOGII,
UNIwersYTET JagIELLOŃSKI-COLLEGIUM MEDICUM,
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

* E-MAIL: JELONEK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Streszczenie

Wciąż nie udało się otrzymać implantu kostnego, który charakteryzowałby się wysoką biocompatybilnością i bioaktywnością, osteokonduktywnością, odpowiednimi właściwościami mechanicznymi oraz dobrą poręcznością chirurgiczną. Dodatkową zaletą tego typu materiału powinna być możliwość dostarczenia antybiotyku w wybrane miejsce ludzkiego organizmu w celu zapobiegania rozwojowi potencjalnych infekcji związanych z jego wszczepianiem.

Opracowano nowy kompozytowy nośnik leku, składający się z porowatych granulek hydroksyapatytowych pokrywanych poli(D,L-laktydem) z klindamycyną, mający znaleźć zastosowanie jako implant kostny w chirurgii szczękowo-twarzowej. Właściwości materiałów wykorzystanych do produkcji implantu zostały zbadane z użyciem metod XRD, FTIR, BET oraz DSC. Rozmiar i morfologię granulek (250-1000 μm) określono za pomocą mikroskopii SEM. Technika ta posłużyła także do określenia rozmiaru (10-40 μm) oraz rozmieszczenia porów. Udział objętościowy porów został oszacowany za pomocą metody hydrostatycznej. Przygotowano cztery grupy granulek z różną zawartością klindamycyny. Zbadano właściwości uwalniania (trwającego 15-22 dni) leku z warstwy polimerowej. Od pierwszej godziny, aż do końca eksperymentu, obserwowano aktywność bakteriobójczą uwolnionej klindamycyny. W przypadku dwóch grup granulek przez pierwszych pięć dni szczep bakteryjny gronkowca złocistego wykazywał wrażliwość lub średnią wrażliwość na uwolniony lek. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań dowodzą, że opisywany kompozyt może znaleźć zastosowanie jako potencjalny implant kostny i nośnik leków. Prowadzone są dalsze badania nad zaprezentowanym materiałem.

Słowa kluczowe: granule hydroksyapatytowe, poli-laktyd, kompozyt, kontrolowane uwalnianie leku, implant kostny

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 19-29]

HYDROXYAPATITE MICROSPHERES COATED WITH POLY(D,L-LACTIDE) AS BONE FILLER AND ANTIBIOTIC DELIVERY SYSTEM

AGNIESZKA JELONEK^{1*}, AGNIESZKA SKÓRSKA-STANIA¹,
PAWEŁ MYCIŃSKI², JOANNA ZARZECKA²

¹ DEPARTMENT OF CRYSTAL CHEMISTRY AND CRYSTAL PHYSICS,
FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
UL. INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLAND

² DEPARTMENT OF CONSERVATIVE DENTISTRY AND ENDODONTICS,
INSTITUTE OF DENTISTRY,
JAGIELLONIAN UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE,
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW, POLAND

* E-MAIL: JELONEK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

Abstract

The problem of developing the bone implant, characterized by high biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity, suitable mechanical properties and good surgical handiness, is still not solved. Additional advantage of such material should be the capability of delivering an antibiotic to a chosen part of the human body in order to prevent occurrence of post-operative infections.

A novel drug delivery system, composed of porous hydroxyapatite granules with poly(D,L-lactide) coating incorporating clindamycin, was engineered for use as a bone filler in oral and maxillofacial surgery. The properties of the materials, used to obtain the implant, were examined by the use of XRD, FTIR, BET and DSC methods. The size (250-1000 μm) and morphology of granules were determined with SEM. This technique was also applied to investigate the size (10-40 μm) and distribution of pores. The solvent accessible pore volume was evaluated by the hydrostatic method. Four groups of granules with different concentrations of clindamycin were prepared. The properties of drug release (lasting 15 to 22 days) from the polylactide layer were studied. The antimicrobial activity of the released clindamycin was observed from the first hour till the end of the experiment. The Staphylococcus aureus strain was susceptible or intermediately susceptible to the released drug during first 5 days for two studied groups. These experimental results indicate that the studied composite material may be used as a potential bone implant and drug carrier. The described system is still under investigation.

Keywords: hydroxyapatite granules, polylactide, composite, controlled drug release, bone implant

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 19-29]

Kość jest naturalnym kompozytem składającym się z organicznej matrycy, którą stanowi kolagen oraz z nieorganicznej fazy ceramicznej - hydroksyapatytu. Dodatkowo kość zawiera wodę oraz niewielką ilość innych substancji organicznych, takich jak białka, polisacharydy i lipidy. Dzięki swojej budowie, kość charakteryzuje się dużą elastycznością oraz dobrymi właściwościami mechanicznymi [1,2]. Dlatego najodpowiedniejszym implantem kostnym do zastosowań w chirurgii twarzoczaszki wydaje się być materiał kompozytowy, który łączy w sobie twardość i sztywność ceramiki z elastycznością i wytrzymałością polimeru.

Hydroksyapatyt jest materiałem ceramicznym, którego skład jest zbliżony do składu mineralnej fazy kości. Cechy takie jak: biogodność, bioaktywność, osteokonduktywność i odporność w środowisku biologicznym czynią go dobrym materiałem zastępczym dla kości. Niska wytrzymałość mechaniczna ogranicza jednak jego zastosowanie do miejsc w organizmie nie przenoszących dużych obciążeń mechanicznych. Hydroksyapatyt może być stosowany w ortopedii w postaci proszku, granul, bloków oraz pokryć [3,4]. Jedną z najważniejszych cech implantów ceramicznych jest ich porowatość. Dzięki fizycznemu „zakotwiczeniu” kości w porach materiału, tworzy się silne wiązanie między implantem a tkanką kostną. Wrastanie tkanki kostnej w materiał (osteointegracja) jest możliwe, gdy pory mają odpowiednie rozmiary i morfologię oraz są ze sobą połączone. Biologiczne połączenie występuje w przypadku porów o rozmiarach 100-200 μm . Wówczas obserwuje się wrastanie w implant tkanki kostnej wraz z naczyniami krwionośnymi. Istnieją również doniesienia, według których optymalny rozmiar porów to 250-300 μm [5]. Aby osteointegracja miała miejsce, średnica połączeń między porami powinna wynosić co najmniej 20 μm , zaś średnica mikroporów - 50 μm [4]. Adsorpcja białek oraz różnicowanie komórek kostnych w implancie następuje nawet w przypadku porów o mniejszych rozmiarach [2].

Polilaktyd należy do biodegradowalnych poli(α -hydroksoestrów) [6]. Występuje w formie dwóch izomerów optycznych: D- i L-laktydu oraz jako ich racemiczna mieszanina - D,L-laktyd. Polilaktyd charakteryzuje się stosunkowo dobrą biogodnością i wytrzymałością mechaniczną, które sprawiają, że materiał ten wykorzystywany jest w medycynie jako tworzywo do produkcji nici chirurgicznych, membran oraz nośników leków [7]. Biogodność polilaktydu zależy od masy cząsteczkowej, udziału stereoizomerów D i L, formy implantu oraz techniki jego wytwarzania [8]. W środowisku ludzkiego organizmu polilaktyd ulega degradacji hydrolytycznej. Polimer rozkłada się na oligomery, a następnie na monomery kwasu mlekowego, które następnie są wykorzystywane w cyklu Krebsa [8-10].

Pomimo postępu w medycynie oraz wysokiego poziomu sterylności na salach operacyjnych, nadal istnieje ryzyko wystąpienia infekcji pooperacyjnych. Typowym zakażeniem kostnym pojawiającym się po implantacji jest zapalenie kości i szpiku (łac. Osteomyelitis). Najczęściej zapalenie to wywołane jest przez mikroorganizmy, takie jak gronkowce (w tym gronkowiec złocisty – *Staphylococcus aureus*), pałeczki ropy błękitnej (*Pseudomonas aeruginosa*) oraz rzadziej pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) [11]. W celu zapobiegania rozwojowi infekcji zalecana jest pooperacyjna terapia antybiotykowa. Jednym z antybiotyków, szeroko stosowanych w profilaktyce i leczeniu infekcji kostnych i zębowych, jest klindamycyna. Lek ten posiada szerokie spektrum aktywności antibakteryjnej in vitro i osiąga wysoki poziom w ślinie, płynie dziąsłowym oraz w kościach [12]. W celu dostarczenia substancji antibakteryjnej do źródła zakażenia oraz aby uniknąć wystąpienia potencjalnych skutków ubocznych ogólnej terapii antybiotykowej, projektuje się nośniki leków.

Bone may be considered as a natural composite. The bone matrix consists of the organic polymer phase – collagen and the inorganic ceramic phase – hydroxyapatite. Additionally, bone contains water and small amounts of other organic substances such as proteins, polysaccharides and lipids. Because of its structure, bone is characterized by high flexibility and good mechanical properties [1,2]. Therefore, the most suitable bone implant for maxillofacial surgery should be a composite material, which combines the ceramic hardness and stiffness with the polymer elasticity and toughness.

Hydroxyapatite is a ceramic material, the composition of which is similar to that of the mineral phase of bone. Its biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity and stability in biological environment make hydroxyapatite a good bone substitute. However, the relatively low mechanical strength of hydroxyapatite limits its application to the tissues, which are exposed to low mechanical stress. Hydroxyapatite may be applied in orthopaedics as powder, granules, blocks and coatings [3,4]. One of the most important features of ceramic implants is porosity. Due to physical interlock, the pores could provide strong bonding of bone to the material. Bone tissue ingrowth into the implant (osteointegration) is possible if pores have proper dimensions, morphology and if they are interconnected. The optimal pore size for biological connection is 100-200 μm . In this case bone ingrowth and vascularisation are observed. According to some researchers, the most favourable pores' diameter is 250-300 μm [5]. The minimal suitable size of the interconnections providing osteointegration is above 20 μm , while the macropores' diameter should reach at least 50 μm [4]. Protein adsorption and adhesion of osteogenic cells occur even for smaller pores [2].

Poly lactide is a biodegradable poly(α -hydroxyester) [6], which occurs in three forms: the stereoisomers L- and D-lactide and a racemic mixture - D,L-lactide. The characteristic features of poly lactide are: relatively good biocompatibility and mechanical strength, which allow for its application in medicine as the material for sutures, implants, membranes and drug carriers [7]. The biocompatibility of poly lactide depends on the molecular weight, stereocopolymer composition, implant design and processing techniques [8]. In the human body environment the hydrolytic degradation of poly lactide takes place. The polymer decomposes to oligomers and further to lactic acid monomers, which participate in the Krebs cycle [8-10].

In spite of the progress in medicine and the high level of sterility in the operating rooms, a risk of post-operative infection still exists. A typical bone tissue infection after implantation is osteomyelitis. The most commonly osteomyelitis is caused by microorganisms such as staphylococci (including *Staphylococcus aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* and more rarely, *Escherichia coli* [11]. To prevent the development of infection, a carefully chosen antibiotic post-operative therapy is recommended. One of the antibiotics widely used in medicine for prophylaxis and for the treatment of bone and dental infections is clindamycin. This drug has a broad-spectrum of the antimicrobial activity in vitro and achieves high level in saliva, gingival crevicular fluid and bone [12]. To deliver an antimicrobial agent to the source of the infection and to avoid any potential adverse side effects of systemic antibiotic treatment, drug carriers are designed.

W artykule zaprezentowano nowy hydroksyapatytowo-poli(D,L-laktydowy) kompozytowy implant kostny, który pełni również rolę nośnika leków. Przedstawiony materiał zaprojektowany został w taki sposób, aby łączyć w sobie zalety wchodzących w jego skład materiałów, jednocześnie eliminując wady dotychczasowych tego typu implantów prezentowanych w publikacjach lub dostępnych na rynku. W celu uzyskania możliwie najlepszej poręczności chirurgicznej kompozyt ma formę granul o zróżnicowanym rozmiarze (250-1000 μm), dzięki czemu może dokładnie wypełnić ubytki kostne nawet o najbardziej skomplikowanych kształtach (zróżnicowana wielkość granul polepsza ich upakowanie w ubytku). Hydroksyapatytowe granule, dzięki swojej porowatości, stanowią rusztowanie dla wrastającej w nie kości. Specjalnie dobrany biodegradowalny polimer pokrywający granule (poli(D,L-laktyd)) poprawia wytrzymałość mechaniczną implantu oraz pełni funkcję matrycy dla antybiotyku. Zastosowanym lekiem bakteriobójczym jest klindamycyna, która charakteryzuje się szerokim spektrum działania i stosowana jest do leczenia zakażeń, między innymi tkanek miękkich, kości oraz zakażeń wywołanych przez bakterie beztlenowe w stomatologii. Dodatkową zaletą naszego materiału jest stosunkowo niski koszt jego otrzymania. Dokonano zgłoszenia prezentowanego wynalazku w Urzędzie Patentowym RP (nr P.403470).

Materiały i metody

Synteza hydroksyapatytu

Syntetyczny proszek hydroksyapatytowy (HAP) został otrzymany z $\text{Ca}(\text{OH})_2$ cz.d.a. (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) oraz 85% H_3PO_4 cz.d.a. (Lach-Ner, s.r.o. Republika Czeska) za pomocą mokrej metody strąceniowej [13], temperatura reakcji wynosiła około 40°C. Otrzymany produkt wysuszono w temperaturze 80°C i zmielono w moździerzu. Proszek został następnie poddany procesom kalcynacji w 800°C lub spiekania w 1200°C, z których każdy trwał trzy godziny. Skład chemiczny końcowych produktów potwierdzono metodą dyfraktometrii proszkowej oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR.

Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD) i spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

Pomiar dyfraktometryczny (XRD) dla kalcynowanego i spiekane go proszku hydroksyapatytowego został przeprowadzony z użyciem dyfraktometru X'PERT PRO. Analizę fazową wykonano wykorzystując promieniowanie CuK_α ; zakres pomiaru wynosił $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$.

Kalcynowany i spiekany proszek hydroksyapatytowy został zmielony i zmieszany z KBr. Mieszaninę proszków sprasowano w celu przygotowania pastylek. Próbkę poddano analizie spektrofotometrycznej FTIR (Bruker, Equinox 55).

Powierzchnia właściwa proszku HAP

Powierzchnia właściwa proszków hydroksyapatytowych została oznaczona metodą BET (metoda Brunauera–Emmety–Teller) z wykorzystaniem sorptomietru ASAP 2010 V4.02; adsorbowanym gazem był azot.

Otrzymywanie kompozytu ceramiczno-polimerowego

Poli(D,L-laktyd), w skrócie: PDLLA, został otrzymany w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych Polskiej Akademii Nauk w Zabrze. Masa molowa (M_w) PDLLA wynosiła 80,85 kDa, natomiast dyspersja mas (M_w/M_n) 1,85. Jako rozpuszczalnik polimeru zastosowano aceton cz.d.a (CHEMPUR, Polska).

In this study the new hydroxyapatite-poly(D,L-lactide) composite bone implant, which is also a drug carrier, is presented. The composite was designed to combine the advantages of ceramic and polymer materials, and also to eliminate disadvantages of other implants described in publications or available on the market. In order to achieve the best surgical handiness, the composite has a form of spheres with different sizes (250-1000 μm). This allows our material to fill bone defects, especially with complex shapes because the diversity of granules' sizes improves their packing in the bone cavities. Moreover, thanks to the porosity of the hydroxyapatite spheres, they could be a scaffold for a new-formed bone. Specially chosen biodegradable polymer (poly(D,L-lactide)) covering the granules enhances mechanical strength of the implant and serves as an antibiotic matrix. The drug applied in our composite is clindamycin, which is characterized by a broad spectrum of activity and is used to treat infections of soft tissues, bones and infections with anaerobic bacteria in dentistry. Additional advantage of our material is relatively low cost of its production. The composite presented in this work is under patent application process (application number in Polish Patent Office: P.403470).

Materials and Methods

Synthesis of hydroxyapatite

Hydroxyapatite (HAP) powder was prepared from analytical grades of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH) and 85% H_3PO_4 (Lach-Ner, s.r.o. Czech Republic) using modified wet precipitation method [13]; the reaction temperature was about 40°C. The obtained product was dried at temperature 80°C for 24 h and then crushed using a pestle and a mortar. The powder was calcined at 800°C and sintered at 1200°C, both for 3 hours. The composition of the final products was confirmed by the X-ray diffraction analysis and FTIR spectroscopy.

X-ray diffraction and IR spectroscopy

The X-ray diffraction analysis (XRD) of the calcined and sintered hydroxyapatite powder was carried out by using an X'PERT PRO diffractometer. Phase analysis of the powder was performed using CuK_α radiation, within the range of $10^\circ < 2\theta < 70^\circ$.

The calcined and sintered hydroxyapatite powder was ground and dispersed in KBr powder to form pellets. Samples were analysed using a FTIR spectrophotometer (Bruker, Equinox 55).

Surface area of HAP

The BET surface area of hydroxyapatite powders was determined by applying the standard Brunauer–Emmet–Teller method to the nitrogen adsorption isotherms obtained using a Micromeritics ASAP 2010 V4.02 instrument.

Preparation of ceramic-polymer composite

Poly(D,L-lactide) - PDLLA - was purchased from Center of Polymer and Carbon Materials of the Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland. The PDLLA has a molecular weight (M_w) of 80.85 kDa, the value of its polydispersity index (M_w/M_n) is 1.85. Acetone p.a. (CHEMPUR, Poland) was used as a polymer solvent.

Temperatura zeszklenia (T_g) poli(D,L-laktydu) została określona za pomocą skaningowej kalorymetrii różnicowej (DSC821e Mettler Toledo). Próbkę o masie 8,5 mg umieszczono w aluminiowym naczyniu pomiarowym i ogrzewano do temperatury 200°C. Celem badania było uzupełnienie informacji na temat PDLLA, aby sprawdzić czy pokryte polimerem granule mogą zostać podgrzane do temperatury wrzenia acetonu (56°C), bez wystąpienia niebezpieczeństwa zniszczenia warstwy polimerowej.

Fazę ceramiczną kompozytu stanowiły porowate hydroksyapatytowe granule o sferycznym kształcie. Hydroksyapatyt został zmielony w młynku kulowym i przesiany w celu uzyskania cząstek o średnicy mniejszej niż 100 µm. Porowate granule zostały otrzymane metodą opisaną w literaturze [14]. Porogen stanowiła wieprzowa żelatyna spożywcza typu A (Dr. Oetker Polska Sp. z o.o.), natomiast fazą rozpraszającą olej rzepakowy (Kujawski, ZT „Kruszwica” S.A.).

1 g proszku hydroksyapatytowego dodano do 10% wodnego roztworu żelatyny (0,35 g żelatyny na 3,5 cm³ wody destylowanej) i ogrzano do 36°C. Olej roślinny schłodzono do temperatury 11°C i mieszano na mieszadle magnetycznym o obrotach 400 rpm. Następnie rozpoczęto wkraplanie zawiesiny proszku ceramicznego w żelatynie do mieszającego się oleju. W celu uzyskania granul o zróżnicowanych rozmiarach zmieniano prędkość mieszania w zakresie 400 to 600 rpm. Kiedy cała zawiesina została wkroplona, prędkość mieszania zwiększono do 800 rpm (na 3 minuty) w celu wzmocnienia granul. Otrzymane granule przemyto acetonem i etanolem pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie wysuszono. Aby wypalić żelatynę i uzyskać porowatą strukturę, wygrzewano granule w piecu w temperaturze 600°C przez 30 minut. Uformowany gotowy produkt ceramiczny poddano spiekaniu w temperaturze 1200°C przez 3 h.

W celu wzmocnienia kruchej porowatego materiału pokryto go specjalnie zaprojektowaną warstwą poli(D,L-laktydu). Ceramiczne granule dodano do roztworu PDLLA (15% w/v w acetonie) i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 5 minut. Prędkość mieszania (400 - 800 rpm) dostosowano do warunków zewnętrznych, takich jak temperatura w laboratorium. Czynniki te mogą mieć wpływ na proces pokrywania granul, ponieważ wyższa temperatura otoczenia przyspiesza parowanie rozpuszczalnika, co z kolei zwiększa gęstość roztworu polimeru. Opisana sytuacja wymaga zwiększenia prędkości mieszania granul. Lepkość roztworu była regulowana poprzez odpowiednie zwiększanie prędkości mieszania. Masa pokrycia polimerowego stanowiła około 41% masy granul. Po mieszanii granule poddano suszeniu na podłożu polistyrenowym, w atmosferze powietrza przez 24 godziny. Następnie wysuszony kompozytowy materiał został oddzielony od podłoża. W celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika (acetonu), granule wygrzewano w temperaturze 56°C (temperatura wrzenia acetonu) przez godzinę.

Ceramiczne granule pokryto polimerem z antybiotykiem wykorzystując nową metodę opracowaną w naszym laboratorium. Warstwa polimerowa została przygotowana w sposób analogiczny jak opisano powyżej, z modyfikacją polegającą na dodaniu chlorowodoru klindamycyny (podarowanego przez firmę MIP Pharma GmbH) do roztworu PDLLA (15% w/v w acetonie). Przygotowano cztery grupy granul:

- grupa C1: 0,002 g klindamycyny na 1 cm³ granul
- grupa C2: 0,004 g klindamycyny na 1 cm³ granul
- grupa C3: 0,006 g klindamycyny na 1 cm³ granul
- grupa C4: 0,008 g klindamycyny na 1 cm³ granul

Wszystkie grupy granul suszono na podłożu polistyrenowym w atmosferze powietrza przez 24 godziny i wygrzewano w temperaturze 56°C (temperatura wrzenia acetonu) przez godzinę.

The glass transition temperature (T_g) of poly(D, L-lactide) was determined using differential scanning calorimetry (DSC821e Mettler Toledo). A specimen of about 8.5 mg was placed in an aluminium pan and heated to 200°C. The aim of this examination was to complement the data of PDLLA in order to check if the coated granules could be heated at the boiling temperature of acetone (56°C) without the risk of the destruction of the polymer covering.

The ceramic phase consists of porous hydroxyapatite spherical granules. The calcined HAp powder was ball-milled and sieved to achieve particles of the diameter lower than 100 µm. Porous granules were obtained using the modified technique described earlier [14]. Edible pigskin gelatin type A (Dr. Oetker Polska Sp. z o.o.) was used as a porogen and vegetable oil (rape oil, Kujawski ZT “Kruszwica” S.A.) was applied as a dispersive medium.

1 g of hydroxyapatite powder was added to 10% aqueous solution of gelatin (0.35 g gelatin to 3.5 cm³ of distilled water) and heated to 36°C. Vegetable oil was cooled to 11°C and stirred on a magnetic stirrer at 400 rpm. Then the ceramic-gelatin suspension was added dropwise to the oil. In order to obtain fine granules with different size the velocity of mixing was varied from 400 to 600 rpm. When the whole volume of the suspension was added, the rotation was increased to 800 rpm (for 3 minutes) to harden the granules. The spheres obtained in this stage were washed with acetone and ethanol under reduced pressure and dried. The dry granules were heated at 600°C for 30 minutes to burn out gelatin (in order to obtain open pores) and sintered at 1200°C for 3 h.

For the reinforcement of the brittle porous HAp granules, a poly(D,L-lactide) specially designed covering was prepared. To this aim, the ceramic spheres were added to PDLLA solution (15% w/v in acetone) and mixed using a magnetic stirrer for 5 minutes with the rotation velocity (400-800 rpm) adjusted to the ambient conditions, such as the temperature in the laboratory. This factor may have an influence on the process of the coating, since the higher temperature accelerates the evaporation of the solvent, which in turn increases the density of the polymer solution. The solution viscosity was maintained by adequate increase of the mixing velocity. The polymer covering weight was about 41% of that of the granules. After mixing, the granules were dried on polystyrene plates in air atmosphere for 24 h. Dry composite material was separated from the plates. In order to remove the residues of the solvent (acetone), the granules were heated at the temperature 56°C (boiling temperature of the acetone) for 1 hour.

The ceramic granules, with the antibiotic incorporated into the polymer matrix, were obtained in a new way. Poly(D,L-lactide) layer was prepared as mentioned above, but with a modification consisting in addition of the clindamycin hydrochloride (kindly provided by MIP Pharma GmbH) to the PDLLA (15% w/v in acetone) solution. The portions of clindamycin introduced to the polymer solutions were:

- group C1: 0.002 g clindamycin for 1 cm³ of granules
- group C2: 0.004 g clindamycin for 1 cm³ of granules
- group C3: 0.006 g clindamycin for 1 cm³ of granules
- group C4: 0.008 g clindamycin for 1 cm³ of granules

All groups of granules were dried on polystyrene plates in air atmosphere for 24 hours and heated at the temperature 56°C (boiling temperature of the acetone) for one hour.

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Analiza mikrostrukturalna granul została przeprowadzona metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (Hitachi S-4700 z systemem EDS Noran Vantage, Japan). Przed pomiarem próbki zostały pokryte warstwą przewodzącą: granule ceramiczne bez pokrycia polimerowego napyłono węglem, zaś kompozytowe granule napyłono złotem. Mikrografie otrzymano przy napięciu przyspieszającym 10 kV i prądzie emisyjnym 9500 nA dla pokrytych oraz 11500 nA dla niepokrytych granul.

Badanie udziału objętościowego porów

Udział objętościowy porów w granulach określono za pomocą metody opisanej wcześniej [15]. Suche granule zważono i umieszczono w wodzie destylowanej pod zmniejszonym ciśnieniem na 10 minut (aby woda mogła penetrować nawet głębokie otwarte pory). Następnie umieszczono je w wodzie destylowanej na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przed ponownym ważeniem granule zostały wyjęte z wody i lekko przetrzemyte bibułą filtracyjną. Pomiar masy wykonano dla trzech różnych próbek o tej samej objętości.

Objętość porów (objętość wody zatrzymanej w porach) obliczono ze WZORU 1:

$$V_p = \frac{W_w - W_e}{W_e \cdot d} \quad (1)$$

gdzie W_w to masa granul wypełnionych wodą, W_e to masa pustych granul, a d to gęstość wody ($d = 1,0 \text{ g/cm}^3$).

Oznaczanie wrażliwości bakterii na klindamycynę

Aktywność biologiczna klindamycyny została zbadana za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej [16]. Szczepem wzorcowym był bakteryjny szczep *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Granule z poli(D,L-laktydowym) pokryciem i różną zawartością klindamycyny (grupy C1, C2, C3 i C4) umieszczono w buforze fosforanowym (PBS) o pH 7,4 i temperaturze $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Stosunek objętościowy granul do PBS wynosił $0,5 \text{ cm}^3$ do $4,5 \text{ cm}^3$. W celu określenia aktywności biologicznej uwolnionej klindamycyny z matrycy polimerowej do PBS, 1 cm^3 buforu pobierano i zastępowano świeżym roztworem PBS po 1, 3, 6 i 24 godzinach. Następne próbki były pobierane po kolejnych 24 godzinach aż do 28-go dnia inkubacji. Czysty bufor fosforanowy, bez zanurzonych w nim granul, inkubowany w warunkach eksperymentu, pełnił rolę kontroli negatywnej. Kontrolę absolutną stanowiły roztwory $0,01 \text{ cm}^3$ erytromycyny i $0,01 \text{ cm}^3$ chloramfenikolu nałożone na płytki ze szczepem *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Sporządzono płytki agarowe z dodatkiem szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: $1,5 \text{ cm}^3$ zawiesiny z jednej kolonii bakteryjnej (o gęstości 0,5 w skali McFarlanda), dodano do 250 cm^3 agaru odżywczego Müller-Hinton podgrzanego do temperatury 50°C i po wymieszaniu nałożono do sterylnych szalek Petriego (o średnicy 90 mm) i pozostawiono w temperaturze pokojowej do zastygnięcia. Na każdej szalce lekko zanurzono w agarze po trzy sterylne cylinderki ze stali nierdzewnej. W każdym cylinderku umieszczono próbkę o objętości $0,1 \text{ cm}^3$. Gdy przygotowano wszystkie próbki, szalki przetrzymywano przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie inkubowano przez 18 godzin w 37°C . Po tym czasie zmierzono średnice stref zahamowania i wykonano zdjęcia szalek (Image Station In-Vivo-F, Kodak).

Scanning Electron Microscopy

The microstructural characterization of the granules was carried out by using Scanning Electron Microscopy (Hitachi S-4700 with EDS system Noran Vantage, Japan). Before this investigation, the spheres were covered with conductive coatings: the granules without polymer layer were coated with carbon while the composite granules were covered with gold. The SEM micrographs were observed at 10kV with emission current 9500 nA for covered and 11500 nA for uncovered granules, respectively.

Determination of pore volume fracture

The pore volume fraction of the granules was determined using a modified method described earlier [15]. Dry granules were weighted and placed in distilled water for 10 minutes under reduced pressure (in order to allow water to penetrate even the deep open pores). Then they were immersed in distilled water for 24 h at room temperature. Before reweighting, spheres were removed from the solvent and dried on filter paper. The test was performed in triplicate.

Pore volume (accessible volume of water) was estimated from the FORMULA 1:

$$V_p = \frac{W_w - W_e}{W_e \cdot d} \quad (1)$$

where W_w is the weight of water-filled granules, W_e is the weight of the empty granules and d is the water density ($d = 1.0 \text{ g/cm}^3$).

Clindamycin susceptibility testing

The biological activity of clindamycin was determined with disc diffusion method [16]. Bacterial strain *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was used in this study.

Granules covered with the poly(D,L-lactide) containing different amounts of clindamycin (groups: C1, C2, C3 and C4) were immersed in Phosphate Buffered Saline (PBS) of pH = 7.4 at $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$. The volumetric ratio of the granules to PBS was 0.5 cm^3 to 4.5 cm^3 . To determine the biological activity of clindamycin released from polymer matrix into PBS, 1 cm^3 of PBS was collected and replaced by fresh PBS after 1, 3, 6 and 24 h. Next, the samples were taken every 24 h up to the 28th day of the incubation. The negative control was carried out with PBS only, without immersed granules, stored under experimental conditions. The absolute check was 0.01 cm^3 of erythromycin and 0.01 cm^3 of chloramphenicol applied on the plates inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. All tests were performed in triplicate.

Agar plates with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain were prepared as follows: 1.5 cm^3 of bacteria suspension from one colony (0.5 McFarland standard) was added to 250 cm^3 of Müller-Hinton agar heated to 50°C . After stirring, the mixture was poured into the sterile Petri dishes (90 mm diameter) and left at room temperature to congealing. On every plate three sterile stainless steel cylinders were inserted into the agar. Samples of 0.1 cm^3 were deposited into each cylinder. When all samples were prepared, the plates were stored at room temperature for 30 minutes and then incubated for 18 h at 37°C . After 18 h of incubation, the diameters of the inhibition zones were measured and the photos of the plates were taken (Image Station In-Vivo-F, Kodak).

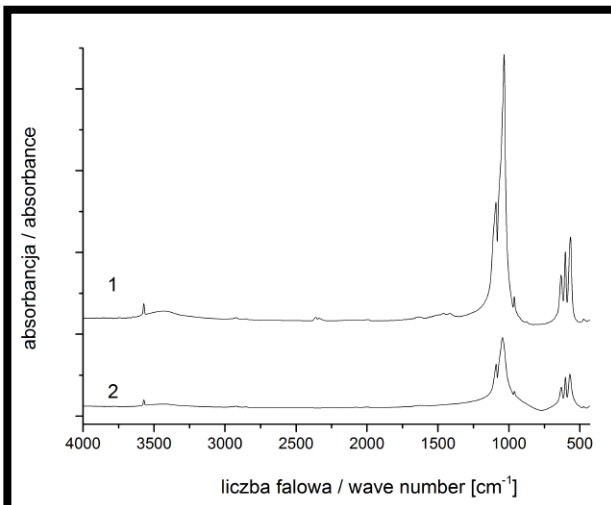
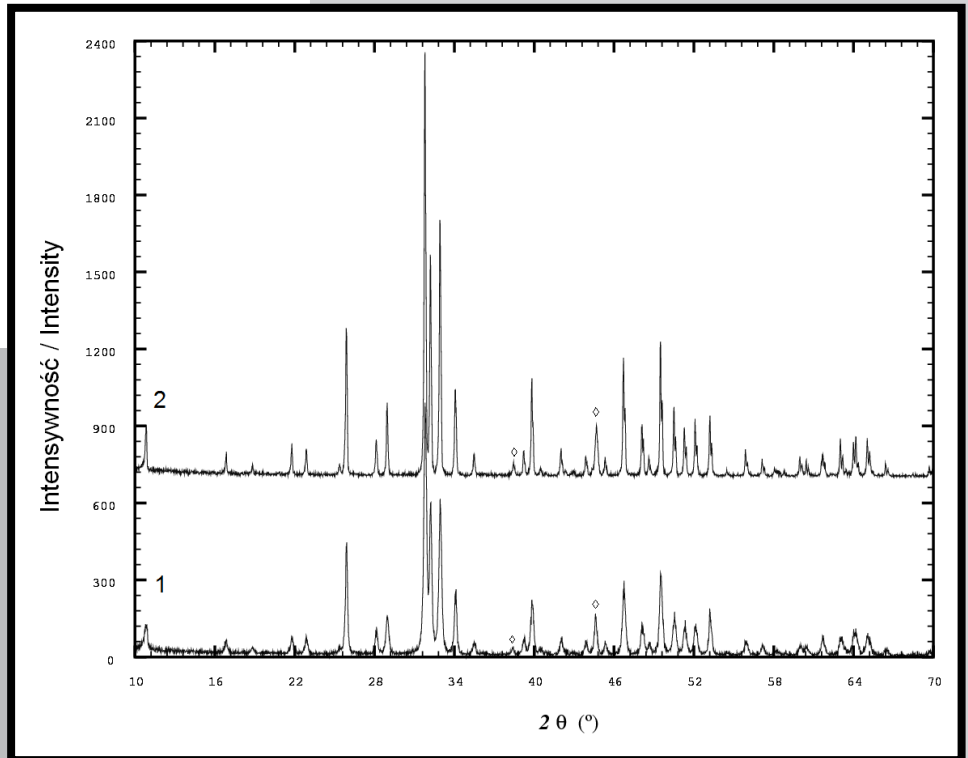
Rentgenowska dyfraktometria proszkowa (XRD) i spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

RYS. 1 przedstawia dyfraktogramy proszków otrzymanych podczas syntezy i obróbki cieplnej. Analiza metodą rentgenowskiej dyfraktometrii proszkowej wykazała, że zarówno kalcynowany jak i spiekany proszek to czysty fazowo syntetyczny hydroksyapatyt. Identyfikacja faz polegała na porównaniu położenia maksimum dyfrakcyjnych uzyskanych podczas badania XRD z danymi zdeponowanymi w International Centre for Diffraction Data (ICDD). Najlepszą zgodność z dyfraktogramem badanej próbki wykazała karta o numerze 04-011-9308 dla HAp o strukturze heksagonalnej. Na dyfraktogramie widoczne są dwie dodatkowe linie dyfrakcyjne, pochodzące od uchwytu próbki wykonanego ze stopu Fe-Ni.

Analiza widma FTIR (RYS. 2) potwierdziła wysoką czystość fazową proszków. W widmie dla grupy PO_4^{3-} występują cztery rodzaje drgań: ν_1 , ν_2 , ν_3 i ν_4 . Wszystkie są widoczne na otrzymanym widmie FTIR proszków hydroksyapatytowych. Na widmie znajdują się również piki pochodzące od drgań charakterystycznych dla grupy OH^- (TABELA 1) [17,18].

RYS. 1. Dyfraktogramy: (1) kalcynowanego i (2) spiekanego hydroksyapatytu. Zaznaczono również dwie linie dyfrakcyjne, należące do uchwytu Fe-Ni.

FIG. 1. X-ray diffraction patterns of calcined (1) and sintered (2) hydroxyapatite powder. The diffraction lines from Fe-Ni sample holder were marked.



RYS. 2. Widmo FTIR kalcynowanego (1) i spiekanego (2) proszku hydroksyapatytowego.
FIG. 2. FTIR spectra of calcined (1) and sintered (2) hydroxyapatite powder.

Results and Discussions

X-ray diffraction and IR spectroscopy

The XRD patterns are shown in FIG. 1. X-ray diffraction analysis proved that the calcined and sintered powder is the synthetic hydroxyapatite without any impurity. The identification of the phases was carried out by comparing the experimental XRD patterns to standards compiled by the International Centre for Diffraction Data (ICDD) using the card with reference code: 04-011-9308 for the hexagonal HAp structure. Two diffraction lines, which do not belong to hydroxyapatite, are those of Fe-Ni sample holder.

The interpretation of FTIR spectra (FIG. 2) confirmed high purity of the powders. In the vibration spectra of PO_4^{3-} the four bands: ν_1 , ν_2 , ν_3 and ν_4 are present. All of them are observed on FTIR spectra of the hydroxyapatite powders obtained by us. There are also the sharp peaks from OH^- vibrations (TABLE 1) [17,18].

TABELA 1. Pasma FTIR dla grup występujących w badanych proszkach hydroksyapatytowych.
TABLE 1. FTIR bands of hydroxyapatite powders.

grupa group	pasmo band	proszek kalcynowany calcined powder	proszek spiekany sintered powder
PO_4^{3-}	ν_1	962 cm^{-1}	
	ν_2	473 cm^{-1}	
	ν_3	1033 cm^{-1}	1044 cm^{-1}
		1091 cm^{-1}	
ν_4	566 cm^{-1}	571 cm^{-1}	
	602 cm^{-1}	601 cm^{-1}	
OH^-		632 cm^{-1}	
		3572 cm^{-1}	

Powierzchnia właściwa proszku HAP

Powierzchnia właściwa otrzymanych hydroksyapatytów wyznaczona metodą BET wynosiła 23 m²/g dla proszku kalcynowanego i 2 m²/g dla proszku spiekane. Różnica w wartościach powierzchni właściwej dla kalcynowanego i spiekane proszku hydroksyapatytowego jest wynikiem obróbki cieplnej materiału. Proces spiekane wpływa na wzrost ziaren, co z kolei skutkuje zmniejszeniem powierzchni właściwej. Obie otrzymane wartości zbliżone są wielkością do wartości powierzchni właściwej dla syntetycznego hydroksyapatytu opisywanych w literaturze [19].

Różnicowa kalorymetria skaningowa PDLA

Różnicowa kalorymetria skaningowa wykazała, że temperatura zeszklenia zastosowanego poli(D,L-laktydu) wynosi 58,61°C. Wartość ta okazuje się być typowa dla amorficznego PDLA (55-60°C) [20].

Skaningowa mikroskopia elektronowa

Analiza metodą SEM potwierdziła, że granule cechują się sferycznym kształtem i średnicą w przedziale 200 do 1000 µm. Powierzchnia niepokrytych granul jest chropowata (RYS. 3) z wieloma otwartymi porami o rozmiarach 10 do 40 µm. Kompozytowe granule pokryte są polimerową warstwą dobrej jakości i wykazują gładką powierzchnię (RYS. 4). RYS. 5 przedstawia morfologię powierzchni granul przed i po pokryciu polimerem. W szczególności RYS. 5B pokazuje jak polimer wypełnia otwarte pory, formując warstwę powierzchniową, która wygładza powierzchnię granuli.

Sferyczny kształt hydroksyapatytowych granul ułatwia odpowiednie upakowanie materiału w małych i nieregularnych ubytkach kostnych. Wolne przestrzenie pomiędzy kompozytowymi granulami umożliwiają osteointegrację. Dodatkowo, komórki kostne dzięki porom otwartym o średnicy 10-40 µm powinny mieć możliwość wnikania w implant. Gładkość granul, z kolei, powinna ograniczyć występowanie stanu zapalnego i wspomóc wzrost kości [21,22].

Granule tego typu mogą znaleźć zastosowanie jako materiał do uzupełniania ubytków twarzoczaszki, do regeneracji kości wyrostka zębodołowego, do leczenia kieszonek kostnych, uzupełniania ubytków kostnych powstałych po hemisekcji, radektomii i amputacji korzenia zęba oraz po usunięciu cyst korzeniowych [5,23].

Specific Surface Area

BET surface area of hydroxyapatite was: 23 m²/g for the calcined powder and 2 m²/g for the sintered one. The difference between values of the surface area of calcined and sintered hydroxyapatite is a result of the thermal treatment of material. The sintering process gives rise to the growth of the grains, which induces decrease of the specific surface area. Both measured values are of the same order of magnitude as those for synthetic hydroxyapatites described earlier [19].

DSC

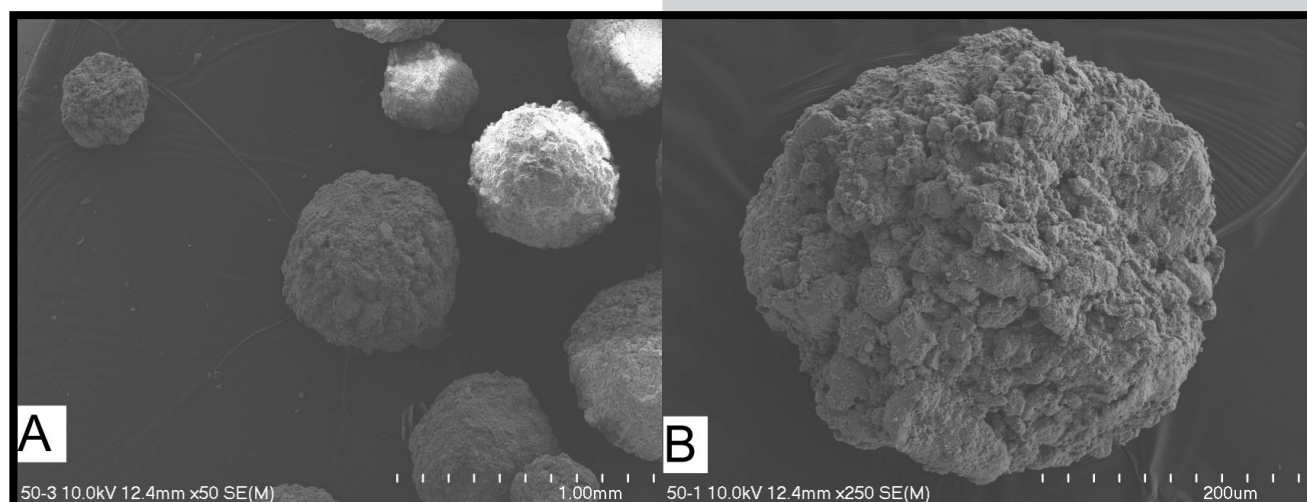
The differential scanning calorimetry has shown that the glass transition temperature of applied poly(D,L-lactide) is 58.61°C. This value is typical for amorphous PDLA (55-60°C) [20].

Scanning electron microscopy

SEM analysis confirmed that the granules have spherical shape and the diameter range from 200 to 1000 µm. Uncovered spheres have rough surface (FIG. 3) with many open pores of different size in the range: 10 to 40 µm. Composite granules have fine polymer covering and exhibited a smooth surface (FIG. 4). The surface morphology of the granules before and after covering is shown in FIG. 5. In particular, FIG. 5B presents how the polymer fills in the open pores and forms the surface layer which smoothes the surface.

The spherical shape of the hydroxyapatite granules facilitates suitable packing of the material in small and irregular bone cavities, while the free spaces between composite spheres enable osteointegration. Additionally, the open pores with diameter 10-40 µm should allow bone cells to penetrate into the implant. The smoothness of the granules should reduce the inflammatory response and promote the bone ingrowth [21,22].

This kind of granules could find an application as the material for reconstruction of craniofacial skeletal defects, alveolar bone regeneration, in treatment of bone sockets, for filling bone defects after: hemisection, radectomy, amputation of tooth root and removal of periapical cysts [5,23].

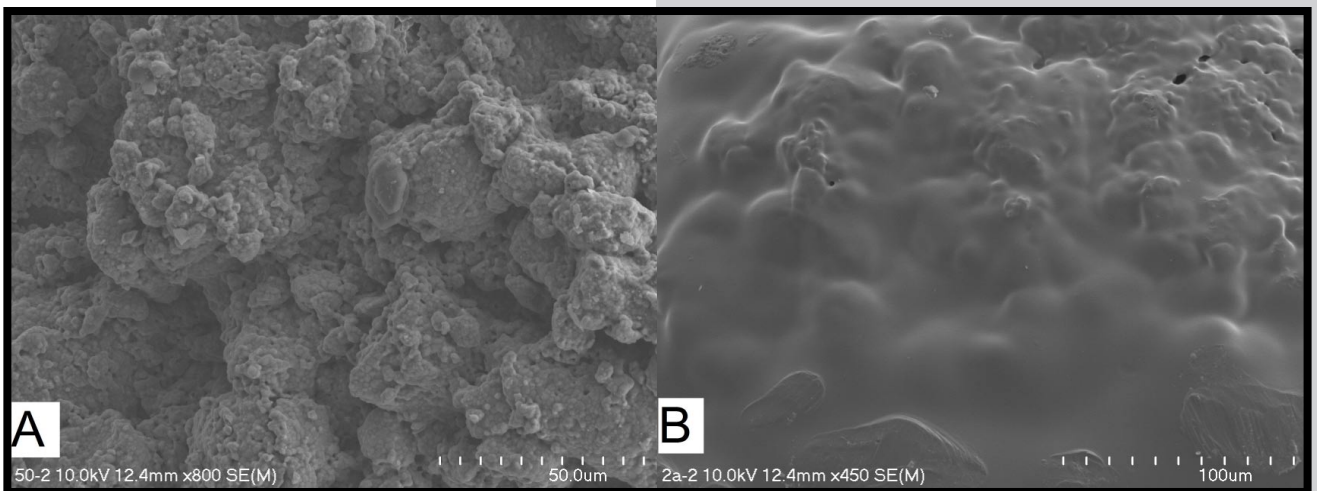


RYS. 3. SEM mikrografie granul hydroksyapatytowych: (A) granule o różnych rozmiarach, (B) porowata granula o średnicy około 400 µm.

FIG. 3. SEM microphotographs of hydroxyapatite granules: (A) granules with different sizes, (B) porous granule with diameter about 400 µm.



RYS. 4. Hydroksyapatytowe granule pokryte poli(D,L-laktydem).
FIG. 4. Hydroxyapatite granules with poly(D,L-lactide) covering.



RYS. 5. Morfologia powierzchni granul: niepokrytej (A) i pokrytej (B) polilaktydem.
FIG. 5. Surface morphology of granules: uncovered (A) and covered (B) with polylactide.

Badanie udziału objętościowego porów

Objętość rozpuszczalnika (wody), wchłoniętego w pory hydroksyapatytowych granul wynosiła 0,4 cm³/g. Pory stanowiły około 40% objętości granul. Badanie metodą SEM wykazało, że rozmieszczenie i rozmiar porów są losowe.

Oznaczanie wrażliwości bakterii na klindamycynę

Na RYS. 6 pokazano strefy zahamowania wzrostu dla klindamycyny. Zaobserwowano biologiczną aktywność uwolnionego antybiotyku dla wszystkich grup granul. Grupa kontrolna (PBS bez inkubowanych w nim granul) nie wykazała efektu hamującego wzrost bakterii. Potwierdzono również wrażliwość bakterii ze szczepu wzorcowego na antybiotyki: erytromycynę i chloramfenikol (kontrola absolutna).

RYS. 7 przedstawia zależność średnicy stref zahamowania od czasu inkubacji granul. W przypadku grup C1, C3 i C4 wielkość średnic stref zahamowania wzrostu dla klindamycyny utrzymywała się w przybliżeniu na stałym poziomie od pierwszej godziny do drugiego dnia eksperymentu, zaś trzeciego dnia zaobserwowano ich spadek. Dla wszystkich grup granul stwierdzono wzrost średnicy stref zahamowania czwartego i piątego dnia inkubacji. Po piątym dniu widoczne było stopniowe zmniejszanie się stref zahamowania. W zależności od ilości klindamycyny inkorporowanej w matrycę polimerową, uwalnianie się leku trwało odpowiednio: 15, 16, 21 lub 22 dni. Po tym czasie nie obserwowano już występowania stref zahamowania wzrostu bakterii.

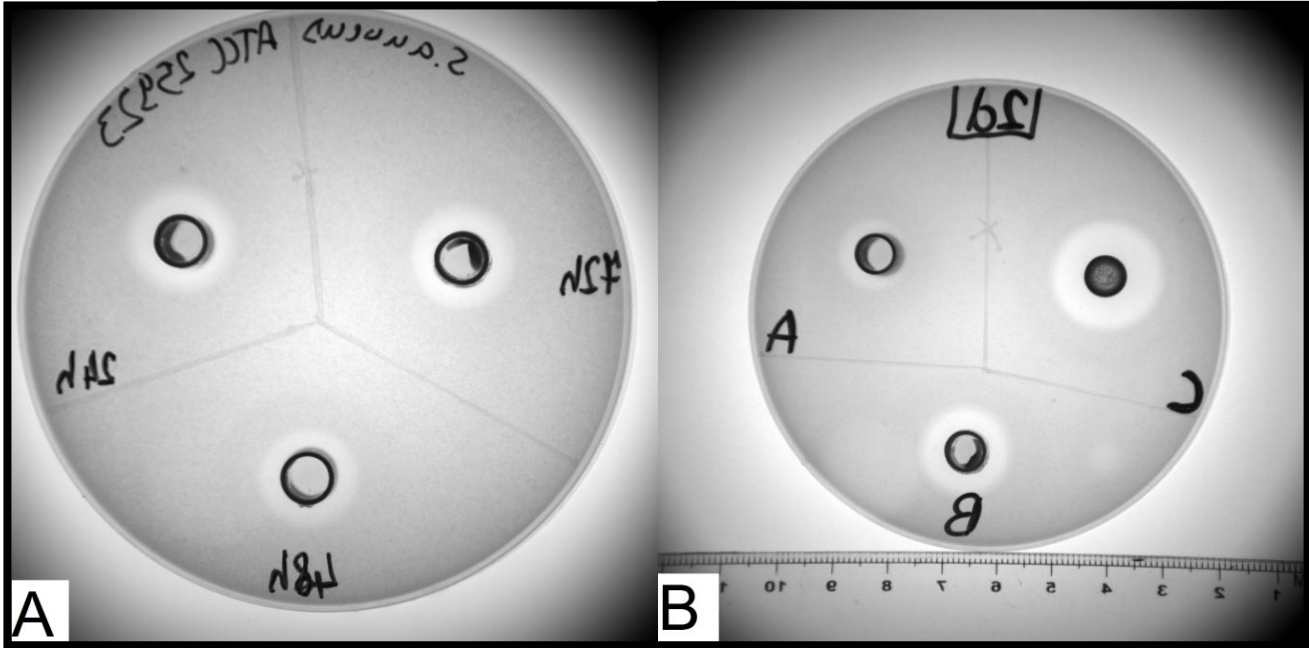
Determination of pore volume fraction

The solvent accessible pore volume in HAp granules was about 0.4 cm³/g. The pores comprised about 40% of the granules' volume. SEM studies showed that the distribution and size of the internal pores is random.

Clindamycin susceptibility testing

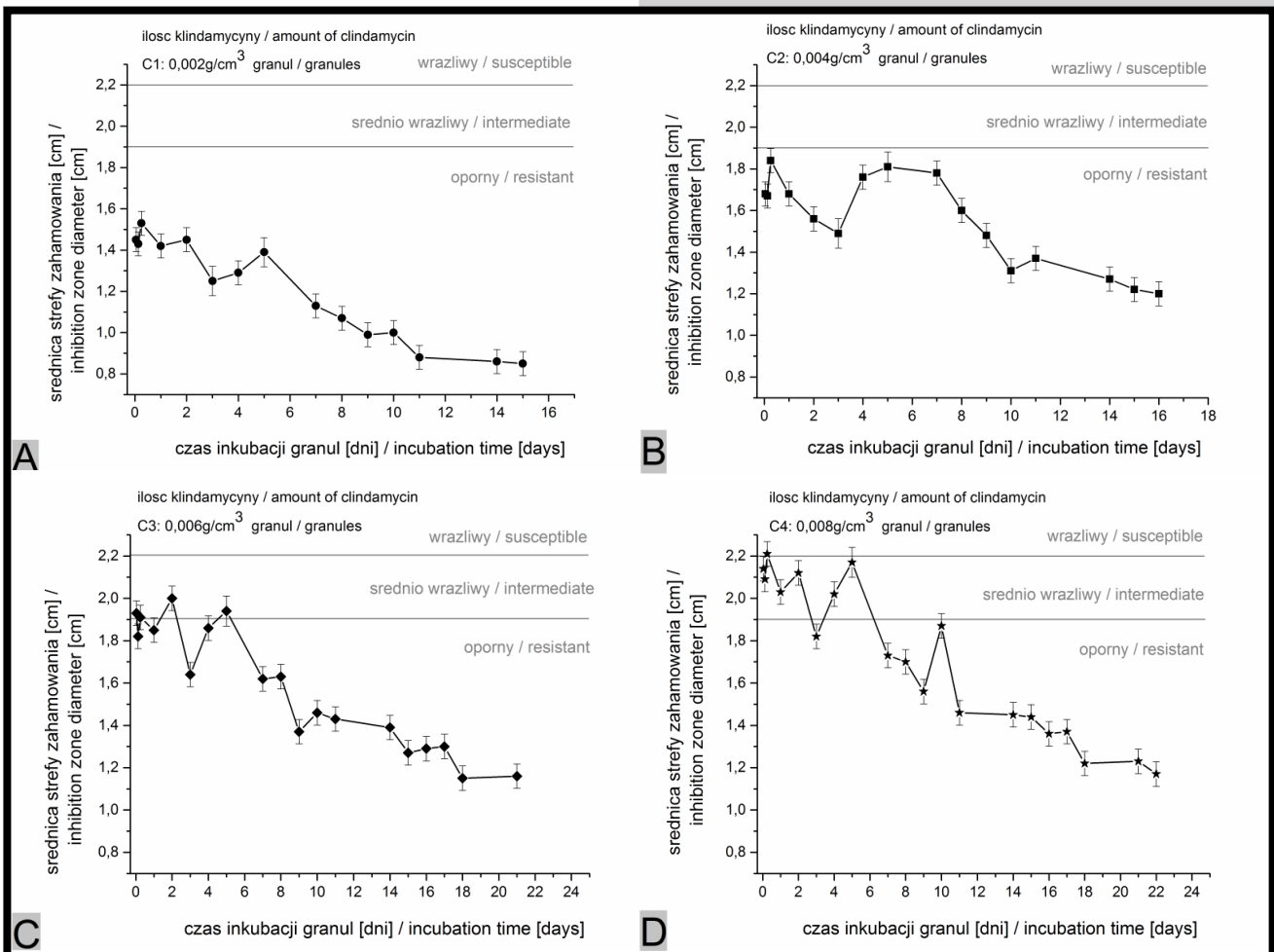
FIG. 6 shows the bacteria inhibition zones for clindamycin. Antibiotic released from all four groups of granules retained its biological activity. Control samples (PBS without immersed granules) did not reveal any inhibitory effect. It was also checked that bacterial strain was susceptible to antibiotics: erythromycin and chloramphenicol (absolute check).

The bacteria inhibition zone diameters as a function of the immersion time are shown in FIG. 7. For the granules from C1, C3 and C4 groups from the first hour to the second day of the experiment the inhibition zone diameters were stable. On the third day the decrease of the diameters was observed. It is characteristic that for all groups of granules on the fourth and fifth day the increase of the inhibition zone diameter is noticeable. After that time the gradual decrease of the inhibition zones occurred. According to the amount of clindamycin incorporated in the polymer layer the releasing of the antibiotic lasted for: 15, 16, 21 and 22 days, respectively. After that time no inhibition zones were observed.



RYS. 6. Przykładowe strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół cylinderków: (A) po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji granul grupy C2, (B) po 24 godzinach inkubacji granul grup C1, C3 i C4.

FIG. 6. Example of the bacteria inhibition zones around the wells: (A) after 24 h, 48 h and 72 h of the immersion of granules from group C2, (B) after 24 h of the immersion of granules from groups C1, C3 and C4.



RYS. 7. Średnica stref zahamowania wzrostu bakterii w funkcji czasu uwalniania się klindamycyny: grupa granul C1 (A), grupa granul C2 (B), grupa granul C3 (C) oraz grupa granul C4 (D).

FIG. 7. Bacteria inhibition zone diameter as a function of release time: group C1 of the granules (A), group C2 of the granules (B) group C3 of the granules (C) and group C4 of the granules (D).

Zgodnie z normami EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) szczep bakteryjny *Staphylococcus aureus* uznawany jest za wrażliwy wobec klindamycyny, jeżeli średnica strefy zahamowania wzrostu jest większa niż 22 mm. W przypadku gdy średnica strefy zahamowania jest mniejsza niż 19 mm szczep uznawany jest za oporny w stosunku do klindamycyny. Natomiast kiedy średnica mieści się w przedziale 19-22 mm szczep określany jest jako średnio wrażliwy [24]. Jak pokazano na RYS. 7 badanie aktywności biologicznej antybiotyku wykazało, że jedynie w pierwszym dniu eksperymentu, dla granul grupy C4, ilość uwolnionej klindamycyny była odpowiednio wysoka i bakterie oznaczały się wrażliwością na ten antybiotyk. Przez pierwszych pięć dni, z wyjątkiem trzeciego dnia, bakterie wykazywały średnią wrażliwość na klindamycynę uwolnioną z otoczki polimerowej granul należących do grup C3 i C4. W pozostałych przypadkach średnica stref była mniejsza niż 19 mm, co oznacza, że ilość uwolnionej klindamycyny była zbyt mała i bakterie wykazywały oporność na antybiotyki.

Wyniki badań aktywności klindamycyny wykazały, że ilość inkorporowanego do granul leku była zbyt niska aby zapobiec rozwojowi bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* i w związku z tym niezbędne są dalsze badania, które pozwolą na uzyskanie kompozytowego nośnika leków o odpowiedniej dawce klindamycyny.

Wnioski

Opracowana nową metodę otrzymywania nośnika klindamycyny w postaci porowatych hydroksyapatytowych granul pokrywanych poli(D,L-laktydem).

Matryca polimerowa zapewnia odpowiednie warunki do uwalniania się klindamycyny. Metoda dyfuzyjno-krażkowa pokazała, że uwalnianie antybiotyku utrzymywało się na stosunkowo stabilnym i wysokim poziomie przez pierwszych pięć dni (z wyjątkiem dnia trzeciego) dla wszystkich granul. Po tym czasie obserwowano stopniowy spadek uwalniania antybiotyku. Niestety, jedynie w pierwszym dniu eksperymentu klindamycyna (o stężeniu 0,008 g/cm³ granul) miała hamujący wpływ na rozwój bakterii. Oznacza to, że stężenie klindamycyny w warstwie polimerowej było zbyt małe. Trwają prace nad ustaleniem odpowiedniej dawki leku bakteriobójczego. Nasze wstępne badania dowiodły, że inkorporowanie większej ilości klindamycyny do opisanego układu jest technologicznie możliwe.

Biorąc pod uwagę opinie stomatologów, doniesienia literaturowe oraz parametry materiałów implantologicznych dostępnych na rynku spodziewamy się, że połączenie porowatego hydroksyapatytowego rdzenia w postaci mikrogranul z degradowalnym poli(D,L-laktydowym) pokryciem, które pełni również rolę matrycy dla klindamycyny, może stanowić potencjalny implant kostny o charakterze nośnika leków. Zaproponowany materiał powinien znaleźć zastosowanie w chirurgii szczękowo-twarzowej.

In compliance with EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), the *Staphylococcus aureus* strain may be recognized as susceptible to clindamycin if the inhibition zone diameter is greater than or equal to 22 mm. The inhibition zone diameter lower than 19 mm means that the strain is resistant to clindamycin. The values of inhibition zone between 19 and 22 mm indicate an intermediately resistant strain [24]. As shown in FIG. 7, the bacterial inhibition assay revealed that only on the first day of the experiment in the group C4 of the granules the released amount of clindamycin was sufficient and the bacterial strain was susceptible to the antibiotic. For the first five days, except the third day, the bacterial strain susceptibility to clindamycin, released from granules of group C3 and C4, was intermediate. In other cases the diameter of inhibition zones was below 19 mm, which means that the amount of released antibiotic was too low and bacteria were resistant.

The results of the clindamycin susceptibility study suggest that the amount of the drug incorporated into the granules was too low to prevent growth of *Staphylococcus aureus*. Further investigations are necessary to obtain a composite drug carrier with suitable amount of clindamycin.

Conclusions

A method for the preparation of a new clindamycin carrier, in the form of porous hydroxyapatite granules covered with poly(D,L-lactide), has been efficiently developed.

The polylactide matrix provides appropriate conditions for the release of clindamycin. The disc diffusion method shows that the antibiotic release was maintained at a relatively high and stable level for the first five days (except the third day) for all the granules. After that time the gradual decreasing of the antibiotic release was observed. Unfortunately, only on the first day of the experiment clindamycin (in concentration of 0.008 g/cm³ of granules) had the inhibitory effect on bacteria. This indicates that the clindamycin concentration in the polymer layer was too low, therefore suitable dose of the antimicrobial agent is still to be adjusted. Our current studies prove that incorporation of higher amount of clindamycin into the system described above is technologically achievable.

Taking into account the opinion of the dentists, the literature reports and the parameters of the purchasable implants we assume that the combination of the hydroxyapatite core shaped like porous microgranules with the poly(D,L-lactide) degradable covering, which is also the matrix for clindamycin, could be potential injectable bone implant and drug delivery system. In conclusion, we believe that the proposed material should find application in the oral and maxillofacial surgery.

Podziękowania

Autorzy dziękują Prof. dr hab. Jackowi Międzobrodzkiemu oraz Mgr Klaudii Polakowskiej z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego za udzielenie konsultacji oraz przeprowadzenie badań antybiotykową metodą dyfuzyjno-krażkową.

Autorzy dziękują również Prof. Barbarze Oleksyn z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego za cenne wskazówki i rady.

Badania zostały zrealizowane z wykorzystaniem aparatury zakupionej ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (projekt POIG.02.01.00-12-023/08).

Badanie metodą SEM zostało przeprowadzone w Laboratorium Mikroskopii Skaningowej z Emisją Polową i Mikroanalizy w Instytucie Nauk Geologicznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. Jacek Międzobrodzki and MSc Klaudia Polakowska from the Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology at the Jagiellonian University for consultation about the bacteria experiment and for performing the disc diffusion method antibiotic testing.

The authors would like to thank Prof. Barbara Oleksyn from the Faculty of Chemistry at the Jagiellonian University for the valuable guidance and advice.

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

The SEM analysis was performed in Laboratory of the Scanning Electron Microscopy with Field Emission and Microanalysis in the Institute of Geological Sciences of the Jagiellonian University.

Piśmiennictwo

- [1] Acosta-Torres L.S., Lopez-Marin L.M., Barcelo F.H., Castano V.M.: Bioengineering of Ceramics: Evolution, Challenges and Opportunities. In: Kumar S.A., Thiagarajan S. and Wang S.-F. (Editors) Biocompatible Nanomaterials: Synthesis, Characterization and Applications, Chapter 1, Nova Science Publishers Inc. New York (2010) 1-22.
- [2] Orlovskii V.P., Komlev V.S., Barinov S.M.: Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. *Inorganic Materials*: 38 (2002) 973-984.
- [3] De Aza P.N.: Progress in Bioceramic Materials. In: Caruta B.M. (Editor): Ceramics and Composite Materials: New Research, Nova Science Publishers Inc. (2006) 101-132.
- [4] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A.: Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8 (2007) 116-123.
- [5] Ślósarczyk A.: Biomateriały ceramiczne. In: Nałęcz M., Błażewicz S., Stoch L.: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000. Tom 4. Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT Warszawa (2003) 99-149.
- [6] Hideto Tsuji, Yoshito Ikada: Blends of aliphatic polyesters. I. Physical properties and morphologies of solution-cast blends from poly(DL-lactide) and poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Applied Polymer Science* 60 (1996) 2367-2375.
- [7] Bendix D.: Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability* 59 (1998) 129-135.
- [8] Weiler A., Hoffmann R.F., Stahelin A.C., Helling H.J., Sudkamp N.P.: Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy* 16 (2000) 305-21.
- [9] Hakkarainen M., Finne-Wistrand A.: Update on Polylactide Based Materials. *Smithers Rapra Technology* (2011) 1-25.
- [10] Li Chun Lin, Shwu Jen Chang, Shyh Ming Kuo, Gregory Cheng-Chie Niu, Hao Kai Keng, Pei Hua Tsai: Preparation and evaluation of β -TCP/polylactide microspheres as osteogenesis materials. *Journal of Applied Polymer Science* 108 (2008) 3210-3217.
- [11] Batchelor A.W., Chandrasekaran M.: Service Characteristics of Biomedical Materials and Implants (Series on Biomaterials and Bioengineering). Imperial College Press (2004) 38-39.
- [12] Brook I., Lewis M.A., Sandor G.K.B., Jeffcoat M., Samaranayake L.P., Vera Rojas J.: Clindamycin In Dentistry: More Than Just Effective Prophylaxis For Endocarditis? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 100 (2005) 550-558.

References

- [13] Osaka A., Miura Y., Takeuchi K., Asada M. and Takahashi K.: Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2 (1991) 51-55.
- [14] Komlev V.S., Barinov S.M., Koplík E.V.: A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials* 23 (2002) 3449-3454.
- [15] Paul W., Sharma C.P.: Development of Porous Spherical Hydroxyapatite Granules: Application towards Protein Delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 383-388.
- [16] Ferraz M.P., Mateus, A.Y., Sousa J.C., Monteiro F.J.: Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: Release kinetics, antimicrobial activity, and interaction with osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 81 (2007) 994-1004.
- [17] Ślósarczyk A., Paluszkiwicz C., Gawlicki M., Paszkiewicz Z.: The FTIR Spectroscopy and QXRD Studies of Calcium Phosphate Based Materials Produced from the Powder Precursors with Different Ca/P Ratios. *Ceramics International* 23 (1997) 297-304.
- [18] Rehman I., Bonfield W.: Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 1-4.
- [19] Joschek S., Nies B., Kortz R., Goopferich A.: Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials* 21 (2000) 1645-58.
- [20] Middleton J.C., Tipton A.J.: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.
- [21] Parsons J., Ricci J.L., Alexander H., Bajpai P.K.: Osteoconductive Composite Grouts for Orthopedic Use. *Bioceramics: Material Characteristics Versus in Vivo Behavior* 523 (1988) 190-207.
- [22] Min-Ho Hong, Jun-Sik Son, Kwang-Mahn Kim, Myung-Ho Han, Daniel S. Oh, Yong-Keun Lee: Drug-loaded porous spherical hydroxyapatite granules for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22 (2011) 349-355.
- [23] Tuli P., Farbod F., Beal B., Jackson I.T.: The use of hydroxyapatite granules for the correction of skeletal facial deformities. *European Journal of Plastic Surgery* 35 (2012) 203-208.
- [24] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 3.1, valid from 2013-02-11.

OCENA BUDOWY CHEMICZNEJ, STRUKTURY FAZOWEJ ORAZ SAMOORGANIZACJI MAKROZĄSTECZEK POLI(ALIFATYCZNO/AROMATYCZNYCH-ESTRO-AMIDO-ETERÓW) (PAAEAE)

JOANNA GAJOWY, MIROŚLAWA EL FRAY*

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, INSTYTUT POLIMERÓW, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, AL. PIASTÓW 45, 70-322 SZCZECIN

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

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu metoksy poli(glikolu etylenowego) (mPEG) o dwóch różnych masach molowych na strukturę chemiczną, mikro-separację fazową oraz samoorganizację makrocząstek w środowisku wodnym poli(alifatyczno/aromatycznych-estro-amido-eterów) (PAAEAE). Do określenia budowy chemicznej produktów reakcji wykorzystano metodę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) oraz różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) do oceny struktury fazowej kopolimerów. Samoorganizację makrocząstek PAAEAE do form micelarnych/nanosferycznych w środowisku wodnym oceniano wykorzystując transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). Spektroskopia ^1H NMR potwierdziła oczekiwaną budowę chemiczną zsyntetyzowanych materiałów. Analiza DSC wykazała, że użycie mPEG o wysokiej masie molowej, czyli 5000 g/mol prowadzi do utworzenia materiału o dobrze zdefiniowanej strukturze fazowej. Materiał ten wykazuje zdolność do samoorganizacji w micelle/nanosfery o hydrofobowym wnętrzu i hydrofilowej powłoce. Może być używany w medycynie do enkapsulacji/immobilizacji różnych witamin i białek.

Słowa kluczowe: nanosfery, metoksy poli(glikol etylenowy), poliestry, pochodne tyrozyny, dimer kwasu tłuszczowego

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 30-34]

Wprowadzenie

Syntetyczne materiały polimerowe odegrały na przestrzeni ostatnich lat znaczącą rolę w zastosowaniach medycznych. Polimerowe biomateriały ze względu na łatwość ich wytwarzania i przetworstwa, racjonalny koszt produkcji oraz pożądane właściwości mechaniczne i fizyczne są stosowane w protezycie, okulistyce, stomatologii, implantologii oraz jako systemy dostarczania i kontrolowanego uwalniania leków [1].

W związku z ogromnymi możliwościami aplikacyjnymi biomateriałów polimerowych, opracowano nową rodzinę kopolimerów – poli(alifatyczno/aromatyczne-estro-amido-eterów), zawierające w swojej strukturze pochodne tyrozyny (DTR), dimer kwasu linoleinowego (DLA) oraz poli(glikol etylenowy) (PEG) lub metoksy poli(glikol etylenowy) (mPEG). Koncepcja opracowania tych materiałów zakładała połączenie bioaktywnych i nietoksycznych monomerów,

EVALUATION OF CHEMICAL STRUCTURE, MICROPHASE SEPARATION AND SELF-ASSEMBLING OF POLY(ALIPHATIC/AROMATIC-ESTER-AMIDE-ETHER)S (PAAEAE)S

JOANNA GAJOWY, MIROŚLAWA EL FRAY*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY SZCZECIN, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, AL. PIASTÓW 45, 70-322 SZCZECIN, POLAND

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

Abstract

In this paper we discuss the influence of poly(ethylene glycol) methyl ether (mPEG) of two different molecular masses on chemical structure, microphase separation and self-assembling of poly(aliphatic/aromatic-ester-amide-ether)s (PAAEAE)s. We used NMR spectroscopy to evaluate chemical structure of synthesized materials as well as DSC analysis to estimate the phase structure. The self-organization of PAAEAEs into micellar/nanospheric structures in aqueous environment was evaluated using transmission electron microscopy (TEM). NMR spectroscopy confirmed chemical structure of synthesized materials. DSC analysis indicated that mPEG of high M_n , namely 5000 g/mol formed a microphase separated structure. The obtained polymeric materials capable to self-organize into micelles/nanospheres with hydrophobic core and hydrophilic shell can be used for medical applications to encapsulate/immobilize various vitamins or antibacterial peptides.

Keywords: nanospheres, poly(ethylene glycol) methyl ether, polyesters, tyrosine derivatives, dimer fatty acid

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 30-34]

Introduction

Synthetic polymers have played an important role in medical therapies, being applied in areas such as modulation of wound healing, implantable medical devices and artificial organs, prostheses, ophthalmology, dentistry, bone repair, and drug delivery systems. Polymeric biomaterials are relatively easy to manufacture into products with various shapes, at reasonable cost, and with desirable mechanical and physical properties [1].

We developed recently a new family of poly(aliphatic/aromatic-ester-amide-ether) (PAAEAE) copolymers containing tyrosine derivatives, dimer of linoleic acid (DLA) and poly(ethylene glycol) (PEG) or poly(ethylene glycol) methyl ether. An original approach in these systems is to combine inherently bioactive and nontoxic monomers, namely long chain fatty acids and tyrosine derivatives [2]. A combination of appropriate fatty acid (here dimerized fatty acid, DLA [3-6] and tyrosine (Tyr) derivative [7,9-11] as hydrophobic components, and hydrophilic PEG [12,13] should provide new materials with amphiphilic properties.

a mianowicie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz pochodnych aminokwasów [2]. Połączenie odpowiedniego kwasu tłuszczowego (tutaj dimeryzowanego kwasu tłuszczowego, DLA [3-6]) i pochodnych tyrozyny (Tyr) [7,9-11], stanowiących hydrofobową część struktury oraz hydrofilowego PEGu [12,13] powinno prowadzić do utworzenia nowych kopolimerów o amfifilowych właściwościach, zdolnych do samoorganizacji makrocząstek w środowisku wodnym.

Głównym celem pracy było zbadanie wpływu metoksy poli(glikolu etylenowego) na budowę chemiczną oraz strukturę fazową nowo otrzymanych kopolimerów. Amfifilowy charakter kopolimerów został wykazany poprzez samoorganizację makrocząstek w środowisku wodnym do form micelarnych/nanosferycznych.

Materialy i metody

Do otrzymania nowych kopolimerów amfifilowych użyto: pochodne tyrozyny tj. etylowy (DTE) i heksylowy (DTH) ester dezaminotyrozylo-tyrozyny dostarczone dzięki uprzejmości New Jersey Center for Biomaterials, USA. Uwodniony dimeryzowany kwas linoleinowy (DLA) o nazwie handlowej Pripol 1009 i masie molowej $\sim 570 \text{ g/mol}$ został dostarczony dzięki uprzejmości firmy Croda, Holandia. 1-etylo-1'-dimetyloaminopropylkarbodiimid (EDC·HCl) zakupiono w firmie GenScript Biology CRO for Drug Discovery. Inne substancje chemiczne, takie jak metoksy poli(glikol etylenowy) o różnych masach molowych, tj. 1000 g/mol (mPEG₁₀₀₀) i 5000 g/mol (mPEG₅₀₀₀) oraz 4-dimetyloaminopirydyna (DMAP) zakupiono w firmie Aldrich Chemical. W syntezach stosowano rozpuszczalniki klasy HPLC bez wstępnego oczyszczania.

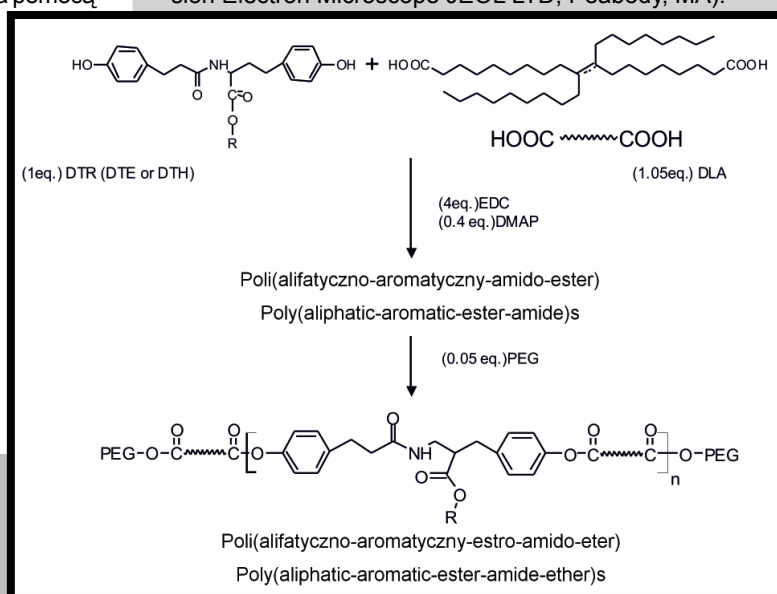
Poli(alifatyczno/aromatyczne-estro-amido-eter) (PAAEAE) były syntezowane w obecności 1-etylo-1'-dimetyloaminopropylkarbodiimidu (EDC·HCl) jako środka sprzęgającego oraz 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP), jako katalizatora, w roztworze dichlorometanu (DCM), w temperaturze pokojowej, w atmosferze gazu obojętnego. Schemat syntezy przedstawiono na RYS. 1.

Budowę chemiczną otrzymanych PAAEAE scharakteryzowano metodą magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR). Widma ¹H NMR otrzymano przy pomocy aparatu VNMRS Varian 400 MHz. Do badań zastosowano deuterowany chloroform CDCl₃ jako rozpuszczalnik, a wszelkie przesunięcia zostały określone względem tertrametylosilanu (TMS). Do analizy widm ¹H NMR wykorzystano oprogramowanie MestReNova.

Strukturę fazową PAAEAE scharakteryzowano za pomocą skaningowej kalometrii różnicowej (DSC), przy pomocy aparatu Mettler-Toledo (DSC823). Próbkę przed badaniem suszono pod próżnią w temperaturze pokojowej przez 2 dni. Proces prowadzono w trzech cyklach: pierwsze grzanie w zakresie od 25°C do 150°C, następnie chłodzenie od 150°C do -50°C i drugie grzanie w zakresie temperatur od -50°C do temperatury 180°C. Proces grzania i chłodzenia prowadzony był z szybkością 10°C min⁻¹.

Morfologia nanosfer PAAEAE powstałych na drodze samo-organizacji makrocząstek w środowisku wodnym była obserwowana przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEM 100CX Transmission Electron Microscope JEOL LTD, Peabody, MA).

RYS. 1. Schemat syntezy poli(alifatyczno-aromatycznych-estro-amido-eterów) (PAAEAE). FIG. 1. Synthesis scheme of poly(aliphatic-aromatic-ester-amide-ether)s (PAAEAE).



The major goal of this work is to investigate the influence of mPEG on the chemical structure and microphase separation of new copolymers. The amphiphilic character was tested in aqueous environment upon self-organization into micelles/nanospheres.

Materials and Methods

Tyrosine derivatives, namely desaminotyrosyltyrosine ethyl ester (DTE) and desaminotyrosyltyrosine hexyl ester (DTH) were kindly provided by the New Jersey Center for Biomaterials, USA. Dimerized fatty acid, a hydrogenated dimerized linoleic acid (DLA), trade name Pripol 1009 of molecular weight $\sim 570 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ was kindly provided by Croda, The Netherlands. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) was obtained from GenScript Biology CRO for Drug Discovery. Other chemicals such as poly(ethylene glycol) methyl ether of different molecular masses, namely 1000 g/mol (mPEG₁₀₀₀) and 5000 g/mol (mPEG₅₀₀₀), and 4-dimethylaminopyridine (DMAP), were obtained from Aldrich Chemical. All solvents of HPLC grade were used without further purification.

Poly(aliphatic-aromatic-ester-amide-ether)s (PAAEAE) were synthesized using of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC·HCl) as the coupling agent and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) as catalyst, in dichloromethane solution (DCM), at room temperature, in an inert gas atmosphere. The synthesis scheme is shown in FIG. 1.

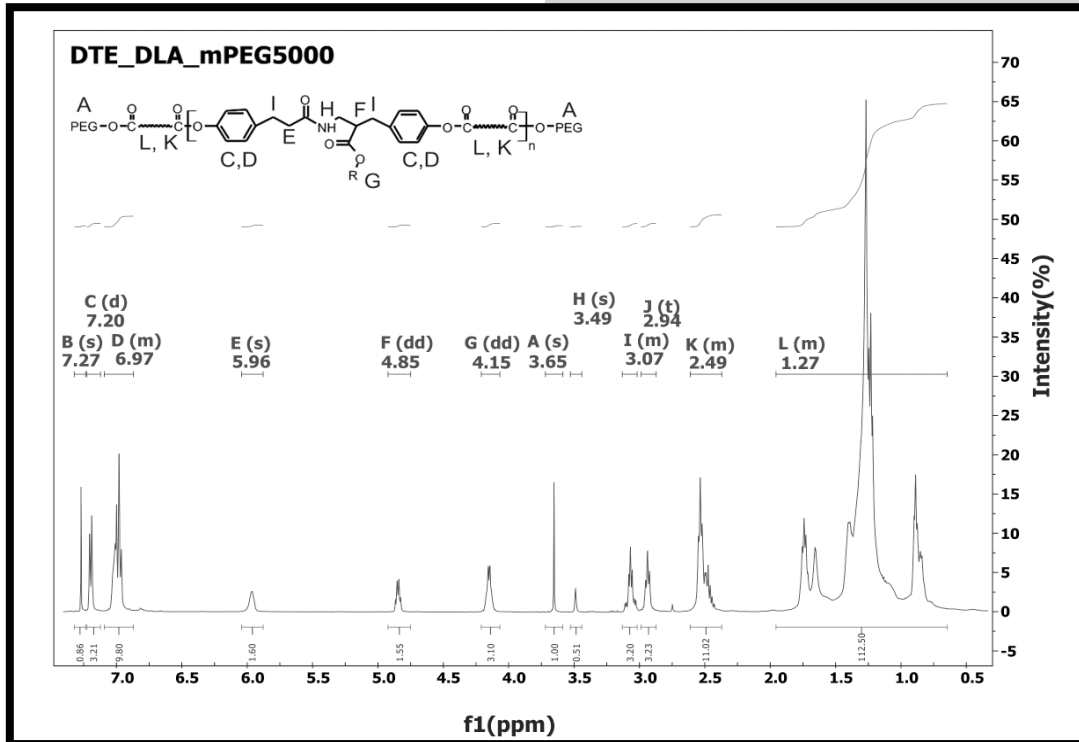
The chemical structure of poly(aliphatic-aromatic-ester-amide-ether)s (PAAEAE)s was characterized by nuclear magnetic resonance (NMR). ¹H NMR spectra were obtained using the Varian VNMRS 400 MHz. CDCl₃ was used as solvent and all shifts were determined with reference to TMS. MestReNova software was used for data analyzing.

The phase structure of PAAEAEs was characterized by differential scanning calorimetry (DSC). DSC scans were performed on the Mettler-Toledo (DSC823) apparatus. The samples were dried under vacuum at room temperature for 2 days. The process was carried out in a triple cycle: first heating in the temperature range from 25°C to 150°C, then cooling in the temperature range from 150°C to -50°C, and second heating in the temperature range from -50°C to 180°C. The rate of heating and cooling was 10°C min⁻¹.

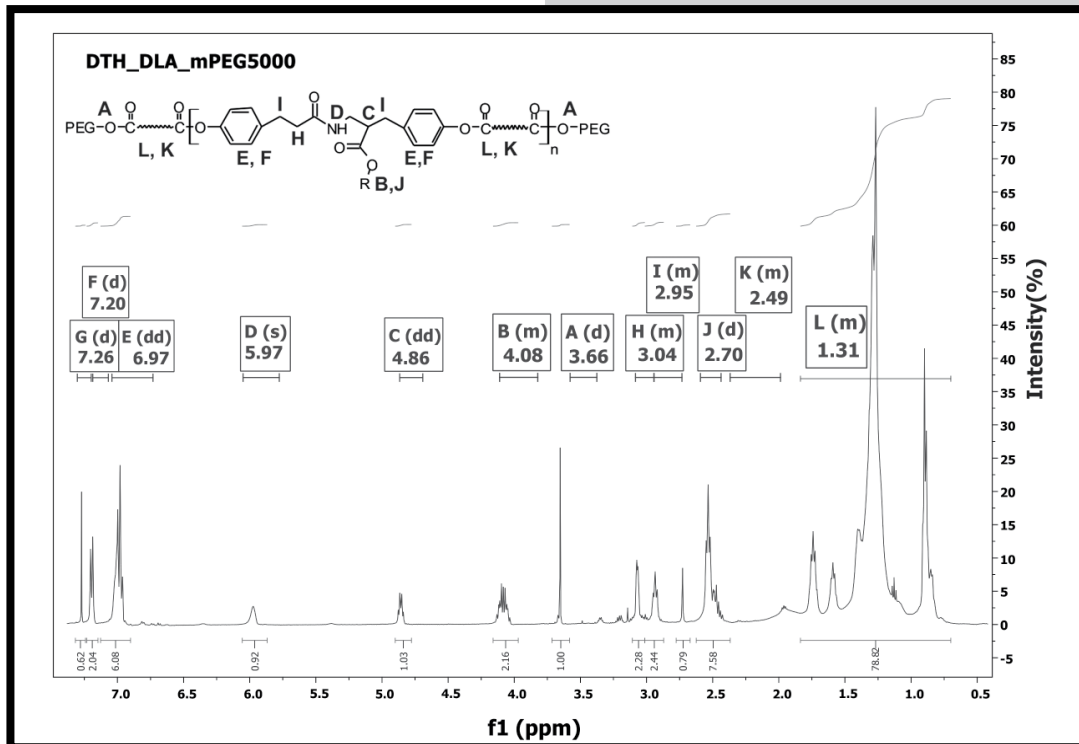
The morphology of PAAEAEs nanospheres formed by the self-assembly of macromolecules was determined using transmission electron microscopy (JEM 100CX Transmission Electron Microscope JEOL LTD, Peabody, MA).

Strukturę chemiczną zsyntetyzowanych kopolimerów PAAEAE potwierdzono metodą magnetycznego rezonansu jądrowego. Analiza widm ^1H NMR potwierdziła, że zsyntetyzowane materiały wykazują oczekiwaną budowę chemiczną. Szczegółową analizę widma ^1H NMR dla materiałów zawierających mPEG₅₀₀₀ przedstawiono na RYS. 2 i 3.

The chemical structure of synthesized PAAEAEs copolymers was verified by nuclear magnetic resonance. The analysis of ^1H NMR spectra confirmed that synthesized materials show expected chemical structure. The results with peaks assignments for materials containing mPEG₅₀₀₀ are presented in details in FIG. 2 and FIG. 3.



RYS. 2. Widmo ^1H NMR dla DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ wraz z przyporządkowaniem przesunięć.
FIG. 2. The ^1H NMR spectrum for DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ with peak assignments.



RYS. 3. Widmo ^1H NMR dla DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ wraz z przyporządkowaniem przesunięć.
FIG. 3. The ^1H NMR spectrum for DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ with peak assignments.

TABELA 1. Wartości temperatur zeszklenia, T_g oraz temperatur topnienia, T_m dla PAAEAE.

TABLE 1. Characteristic temperatures for PAAEAEs: T_g and T_m obtained from 2nd heating cycle.

Polimer / Polymer	T_g (°C)	T_m (°C)
DTE_DLA_mPEG ₁₀₀₀	3.2	-
DTH_DLA_mPEG ₁₀₀₀	-7.4	-
DTE_DLA_mPEG ₅₀₀₀	3.2	60.2
DTH_DLA_mPEG ₅₀₀₀	-9.3	60.0

Analiza widma ^1H NMR dla materiału DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ wykazała następujące przesunięcia: 7,27 ppm (s, chloroform-d), 6,97-7,20 ppm (Ar-H), 5,96 (s, NH), 4,85 (dd, CH - tyrozyna), 4,15 (dd, OCH₂ – boczne ugrupowanie estrowe), 3,65 (PEG - CH₂CH₂), 3,49 (s, metanol), 3,07 (d, CH₂ - DTE), 2,94 (t, CH₂ - DTE), 2,49 (m, CH₂ - DLA), 1,27 (m, CH₂ - DLA).

Analiza widma ^1H NMR dla materiału DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ wykazała następujące przesunięcia: 7,26 ppm (d, chloroform-d), 6,97-7,20 ppm (Ar-H), 5,97 (s, NH), 4,86 (dd, CH - tyrozyna), 4,08 (dd, OCH₂ – boczne ugrupowanie estrowe), 3,66 (PEG - CH₂CH₂), 3,04 (m, CH₂ - DTH), 2,95 (m, CH₂ - DTH), 2,70 (d, CH₂ - DTH), 2,49 (m, CH₂ - DLA), 1,31 (m, CH₂ - DLA).

Analiza termogramów DSC wykazała, że kopolimery zawierające mPEG₁₀₀₀ charakteryzują się występowaniem tylko niskotemperaturowego zeszklenia, T_g , którego wartość przesuwa się w kierunku niższych temperatur dla kopolimerów zawierających DTH, w porównaniu do materiałów zawierających DTE. Brak mikroseparacji fazowej w tych materiałach spowodowany jest utworzeniem homogenicznej mieszaniny krótkołańcuchowego mPEG₁₀₀₀ z fragmentami DLA, tym samym nie zmieniając amorficznego charakteru całego układu. Zastosowanie mPEG₅₀₀₀ prowadzi do otrzymania materiału o dobrze zdefiniowanej strukturze fazowej, co przejawia się występowaniem niskotemperaturowego zeszklenia, T_g oraz wysokotemperaturowego topnienia, T_m . Co ciekawe, zwiększenie długości bocznego łańcucha pochodnej tyrozyny (DTH) obniża T_g do -9,3°C, w porównaniu do 3,2°C dla materiału zawierającego DTE. Wartości temperatur zeszklenia, T_g oraz temperatur topnienia, T_m zebrano w TABELI 1.

Amfifilowy charakter nowych kopolimerów został określony na podstawie procesu emulgacji organicznego roztworu polimeru w wodzie. Hydrofilową otoczkę powstałą na drodze samoorganizacji makrocząsteczek miceli/nanosfery tworzą fragmenty (mPEG), natomiast dimeryzowany kwas tłuszczowy (DLA) oraz pochodne tyrozyny (Tyr) budują hydrofobowy rdzeń struktury. Schemat miceli DLA/Tyr-PEG pokazano na RYS. 4.

Morfologię takich struktur zawierających mPEG₅₀₀₀ określono przy pomocy transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Jak widać na RYS. 5, w wyniku spontanicznego łączenia się makrocząsteczek w wodzie utworzyły się nanosfery o wielkości od 50 nm do 200 nm.

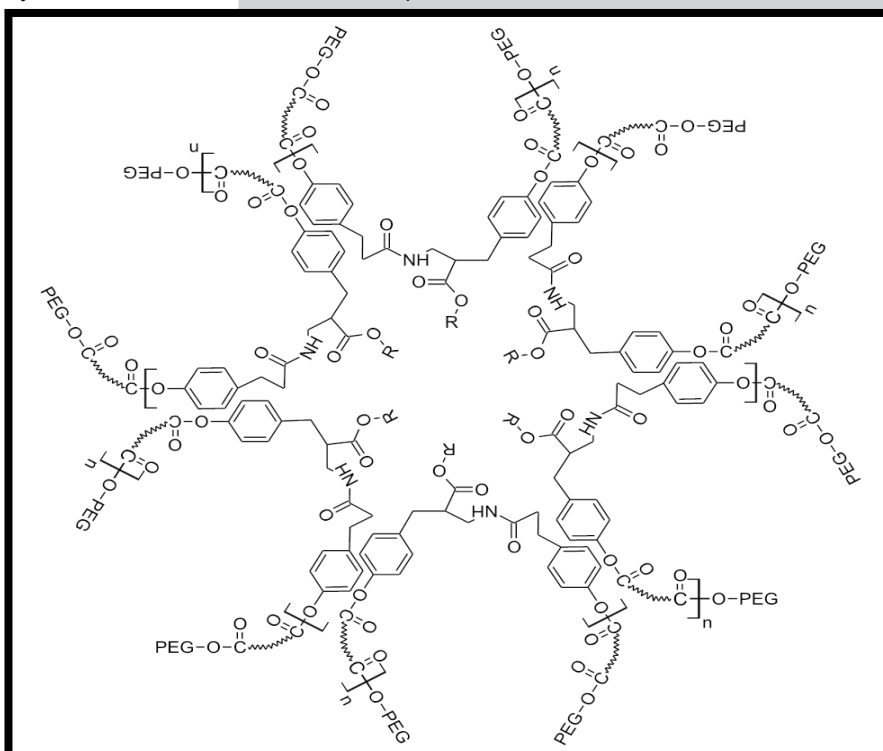
The detailed analysis of NMR spectrum for DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ material revealed the following shifts: 7.27 ppm (s, chloroform-d), 6.97-7.20 ppm (Ar-H), 5.96 (s, NH), 4.85 (dd, CH of tyrosine), 4.15 (dd, OCH₂ of the pendent ester group), 3.65 (CH₂CH₂ of PEG), 3.49 (s, methanol), 3.07 (d, CH₂ of DTE), 2.94 (t, CH₂ of DTE), 2.49 (m, CH₂ of DLA), 1.27 (m, CH₂ of DLA).

The detailed analysis of NMR spectrum for DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ material revealed the following shifts: 7.26 ppm (d, chloroform-d), 6.97-7.20 ppm (Ar-H), 5.97 (s, NH), 4.86 (dd, CH of tyrosine), 4.08 (dd, OCH₂ of the pendent ester group), 3.66 (CH₂CH₂ of PEG), 3.04 (m, CH₂ of DTH), 2.95 (m, CH₂ of DTH), 2.70 (d, CH₂ of DTH), 2.49 (m, CH₂ of DLA), 1.31 (m, CH₂ of DLA).

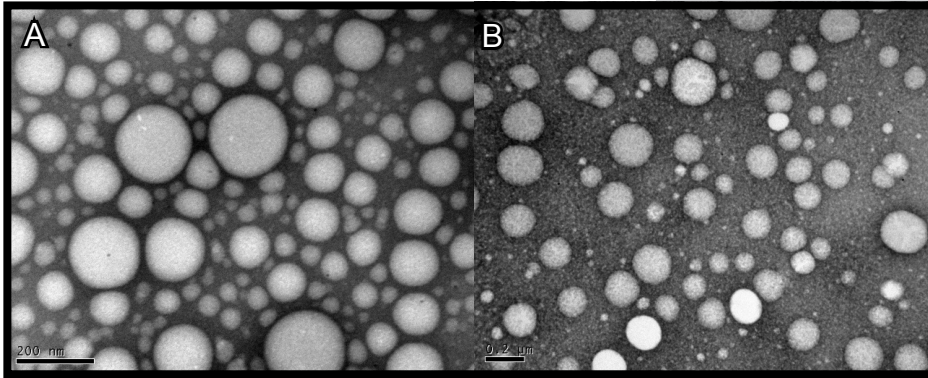
The DSC analysis of copolymers containing mPEG₁₀₀₀ show only low temperature T_g , which is shifting towards lower temperatures for copolymers containing DTH building block, as compared to materials containing DTE. Short chain mPEG₁₀₀₀ is forming a homogenous mixture with DLA soft blocks, thus the whole system is amorphous. When mPEG₅₀₀₀ is used, a microphase separated structure is formed as manifested by the presence of low temperature T_g and high temperature T_m . Interestingly, increasing the length of pendant chain in tyrosine derivative (DTH) lowered T_g to -9.3°C as compared to 3.2°C for material containing DTE. Characteristic glass transition temperature, T_g and melting temperature, T_m values are collected in TABLE 1.

The amphiphilic character of new copolymers was determined by emulsification of polymer solution in water. The hydrophilic shell is composed of (mPEG), while dimerized fatty acid (DLA)/tyrosine (Tyr) are creating hydrophobic core. The schematic structure of DLA/Tyr-PEG self-assembled micelle is shown in FIG. 4.

The morphology of such structures for PAAEAEs containing mPEG₅₀₀₀ was determined using transmission electron microscopy (TEM). As can be seen in FIG. 5, nanospheres ranging in size from 50 nm to 200 nm were spontaneously formed in aqueous environment.



RYS. 4. Budowa chemiczna miceli zawierającej DLA/Tyr-PEG.
FIG. 4. The chemical structure of micelle containing DLA/Tyr-PEG.



RY. 5. Obrazy TEM (negatywne skontrastowane) dla uformowanych w środowisku wodnym nanosfer DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ (A) oraz DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ (B). FIG. 5. TEM images (negative staining) for DTE_DLA_mPEG₅₀₀₀ (A) and DTH_DLA_mPEG₅₀₀₀ (B) forming nanospheres.

Wnioski

Z powodzeniem udało nam się zsyntetyzować nowe materiały polimerowe bazując na nietoksycznych komponentach tj. pochodnej aminokwasu, kwasie tłuszczowym i metoksy poli(glikolu etylenowym) (mPEG). Protonowa spektroskopia NMR potwierdziła oczekiwaną strukturę chemiczną otrzymanych materiałów. Analiza DSC wykazała amorficzną strukturę materiałów zawierających mPEG₁₀₀₀ oraz mikroseparację fazową w PAAEAE zawierających mPEG₅₀₀₀.

Dla materiałów zawierających mPEG₅₀₀₀ przetestowano amfifilowy charakter nowo otrzymanych PAAEAE kopolimerów poprzez emulgację organicznego roztworu kopolimeru w wodzie. Utworzone w wyniku samoorganizacji makrocząsteczek formy micelarne/nanosferyczne obserwowano przy użyciu mikroskopu TEM.

Otrzymane materiały polimerowe samoorganizujące się w środowisku wodnym do form micelarnych/nanosferycznych, składające się z hydrofobowego rdzenia oraz hydrofilowej otoczki mogą być zastosowane do enkapsulacji/immobilizacji związków bioaktywnych, np. witamin lub przeciwdrobnoustrojowych peptydów dla zastosowań medycznych.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, nr projektu: DEC-2011/03/B/ST8/06353. Doktorantka, Joanna Gajowy pragnie podziękować New Jersey Center for Biomaterials za możliwość odbycia stażu, w trakcie którego wykonała większość prac opisanych w niniejszej publikacji.

Conclusions

We successfully synthesized a new polymeric materials based on amino acid, fatty acid and poly(ethylene glycol)methyl ether (mPEG). The proton NMR spectroscopy confirmed the expected chemical structure of these new materials. DSC analysis evidenced an amorphous structure for materials containing mPEG₁₀₀₀, and microphase separated structure for poly(aliphatic/aromatic-ester-amide-ether)s containing mPEG₅₀₀₀.

The amphiphilic character of these materials was tested upon emulsification where self-organization of DTR_DLA_mPEG₅₀₀₀ into micellar/nanospheric structures in aqueous environment was noticed. The nanospheres formation was evidenced by TEM.

The obtained results give a good promise for further work on self-organization of PEA EA into well-defined micells/nanospheres with hydrophobic core and hydrophilic shell, thus being capable to encapsulate/immobilize various vitamins or antibacterial peptides for medical applications.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Research Centre (NCN) project DEC- 2011/03/B/ST8/06353. PhD student, J. Gajowy would like to thank the New Jersey Center for Biomaterials for support during her summer internship.

Piśmiennictwo

- [1] Wang Y.A., Robertson J.L., Spillman W.B. Jr., Claus R.O.: Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility. *Pharmaceutical Research* 21 (2004) 1362-1373.
- [2] Bourke S.L., Kohn J.: Polymers derived from the amino acid L-tyrosine: polycarbonates, polyarylates and copolymers with poly(ethyleneglycol). *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (2003) 447-466.
- [3] El Fray M., Prowans P., Slonecki J.: Biocompatibility studies of new multiblock poly(ester-ester)s composed of poly(butylene terephthalate) and dimerized fatty acid. *Biomaterials* 23 (2002) 2973-2978.
- [4] El Fray M., Altstädt V.: Fatigue behaviour of multiblock thermoplastic elastomers. 1. Stepwise increasing load testing of poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers. *Polymer* 44 (2003) 4635-4642.
- [5] El Fray M., Altstädt V.: Fatigue behaviour of multiblock thermoplastic elastomers. 2. Dynamic creep of poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers. *Polymer* 44 (2003) 4643-4650.
- [6] El Fray M., Altstädt V.: Fatigue behaviour of multiblock thermoplastic elastomers. 3. Stepwise increasing strain test of poly(aliphatic/aromatic-ester) copolymers. *Polymer* 45 (2004) 263-273.
- [7] Macario D.K., Entersz I., Bolikal D., Kohn J., Nackman G.B.: Iodine inhibits antiadhesive effect of PEG: Implications for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 86B (2008) 237-244.

References

- [8] Nardin C., Bolikal D., Kohn J.: Nontoxic Block Copolymer Nanospheres: Design and Characterization. *Langmuir* 20 (2004) 11721-11725.
- [9] Kilfoyle B.E., Sheihet L., Zhang Z., Laohoo M., Kohn J., Michniak-Kohn B.: Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *Journal of Controlled Release* 163 (2012) 18-24.
- [10] Sheihet L., Garbuzenko O.B., Bushman J., Gounder M.K., Minko T., Kohn J.: Paclitaxel in tyrosine-derived nanospheres as a potential anti-cancer agent: In vivo evaluation of toxicity and efficacy in comparison with paclitaxel in Cremophor. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (2012) 320-329.
- [11] Batheja P., Sheihet L., Kohn J., Singer A.J., Michniak-Kohn B.: Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *Journal of Controlled Release* 149 (2011) 159-167.
- [12] Chawla K., Lee S., Lee B.P., Dalsin J.L., Messersmith P.B., Spencer N.D.: A novel low-friction surface for biomedical applications: Modification of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) with polyethylene glycol(PEG)-DOPA-lysine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 90 (2009) 742-749.
- [13] Kobayashi M., Terayama Y., Kaido M., Suzuki A., Ishihara K., Takahara A.: Friction behavior of high-density poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) brush in aqueous media. *Soft Matter* 3 (2007) 740-746.

WŁAŚCIWOŚCI STOPU Ti-6Al-4V PO MODYFIKACJI POWIERZCHNI

GRZEGORZ ADAMEK*, JAROSŁAW JAKUBOWICZ

POLITECHNIKA POZNAŃSKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
PL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 5, 60-965 POZNAŃ, POLSKA
* E-MAIL: GRZEGORZ.ADAMEK@PUT.POZNAŃ.PL

Streszczenie

W pracy badano właściwości porowatego stopu Ti-6Al-4V istotne z punktu widzenia zastosowań na implanty tkanek twardych. Stop wytworzono za pomocą procesu mechanicznej syntezy, prasowania i spiekania. Modyfikację powierzchni prowadzono dwuetapowo: pierwszym było elektrochemiczne trawienie w 1M H₃PO₄ + 2% HF w 10 V przez 30 min, a drugim osadzanie ceramiki fosforanowo wapniowej (Ca-P) z wodnego roztworu 0,042M Ca(NO₃)₂ + 0,025M (NH₄)₂HPO₄ + 0,1M HCl. Jony wapnia i fosforanowe osadzają się w głębi porów, co polepsza wytrzymałość połączenia ceramicznej powłoki z metalicznym podłożem. Wytrzymałość była o ponad 50% większa dla porowatego stopu niż dla litego odpowiednika. Odporność korozyjną badano w roztworze Hanka symulującym środowisko płynów ustrojowych (SBF). Po osadzeniu powłoki Ca-P zaobserwowano niewielką poprawę gęstości prądu korozyjnego w stosunku do próbki polerowanej. Zbadano również biogodność stopu po modyfikacji powierzchni w testach *in vitro*. Powierzchnia po elektrochemicznej modyfikacji wykazuje dobrą biogodność, a powłoka Ca-P wspomaga wzrost i proliferację osteoblastów.

Ze względu na porowatość, stosunkowo dobrą wytrzymałość połączenia i biokompatybilność powierzchni stop Ti-6Al-4V po elektrochemicznej modyfikacji wydaje się być dobrym materiałem na implanty tkanek twardych.

Słowa kluczowe: Ti-6Al-4V, odporność korozyjna, wytrzymałość połączenia metal/ceramika, biogodność

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 35-40]

Wprowadzenie

Stopy tytanu ze względu na swoje bardzo dobre właściwości fizykochemiczne i mechaniczne są jednymi z najczęściej wykorzystywanych materiałów na implanty. Stop Ti-6Al-4V był pierwszym stopem tytanu wykorzystywanym w medycynie. Posiada on dobre właściwości mechaniczne [1-3]. Jego największą wadą jest skład chemiczny. Zarówno wanad jak i glin są pierwiastkami uznanymi za cytotoksyczne, a jako produkty korozji biologicznej mogą powodować choroby takie jak otępienie starcze [4]. Mimo to stop Ti-6Al-4V jest w dalszym ciągu popularny. Polepszenia właściwości takich jak odporność korozyjna czy biogodność można dokonać za pomocą modyfikacji powierzchni. Powierzchnia rozwinięta (porowata) korzystnie wpływa na proces osteointegracji, co z kolei skutkuje szybszym narastaniem tkanki i silniejszym wiązaniem implantu z kością. Ponadto, aby zwiększyć biogodność materiału na implanty na powierzchnię można nanieść powłokę fosforanowo-wapniową (Ca-P) [5].

PROPERTIES OF THE BIOFUNCTIONALIZED SURFACE OF Ti-6Al-4V ALLOY

GRZEGORZ ADAMEK*, JAROSŁAW JAKUBOWICZ

POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
M. SKŁODOWSKA-CURIE 5 SQ., 60-965 POZNAŃ, POLAND
* E-MAIL: GRZEGORZ.ADAMEK@PUT.POZNAŃ.PL

Abstract

Properties of a porous Ti-6Al-4V alloy, important in hard tissue implants applications, were investigated. The alloy was prepared by mechanical alloying followed by pressing, sintering and subsequent anodic electrochemical etching in 1M H₃PO₄ + 2% HF electrolyte at 10 V for 30 min and bioactive ceramic Ca-P layer deposition, using a mixture of 0.042M Ca(NO₃)₂ + 0.025M (NH₄)₂HPO₄ + 0.1M HCl dissolved in distilled water. The Ca²⁺ and PO₄³⁻ ions penetrate the pores preferentially inside, which results in improved bonding of the bioceramic layer to the metallic substrate. The bond strength obtained by a tensile test shows more than 50% higher strength to the porous Ti-6Al-4V substrate than to the bulk material. The corrosion resistance of the alloys was investigated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) which is simulated body fluid (SBF). We observed slight improvement in corrosion current density after etching and additional Ca-P deposition compared to mechanically polished samples. The biocompatibility of the Ti-6Al-4V alloy with a porous Ca-P layer was investigated. We showed that the rough, electrochemically biofunctionalized surface supported osteoblast cell growth and proliferation.

Due to rough morphology, relatively strong bonding to the metallic substrate and *in vitro* biocompatibility the electrochemically modified surface of the ultrafine grained Ti-6Al-4V is promising for hard tissue implant applications.

Keywords: Ti-6Al-4V, corrosion resistance, metallic/ceramic bond strength, biocompatibility

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 35-40]

Introduction

Ti-based materials are most commonly used for implants fabrication, because of their excellent physicochemical and mechanical properties. The Ti-6Al-4V was one from the firstly used Ti-based alloys for biomedical applications. This alloy shows good mechanical and chemical properties, respective for implant applications [1-3]. Unfortunately, V and Al elements exhibit high cytotoxicity and as biological corrosion products may induce senile dementia [4]. Nevertheless Ti-6Al-4V is still one of the most popular metallic implant materials. Improvement in corrosion resistance and biocompatibility of this alloy can be made by surface modification techniques. It is known that a rough surface is attractive for the osseointegration process, which results in fast tissue growth and strong bone bonding with the implant. Moreover, to improve the bioactivity of the alloy for hard tissue implants applications, a bioactive layer of a calcium-phosphate ceramic (Ca-P) is required on its surface [5].

Porowatość na powierzchni biomateriałów można uzyskać różnymi metodami: obróbką strumieniowo-ścierną, metodami wytwarzania porowatości objętościowej w materiale (co zapewnia jednoczesną porowatość na powierzchni) lub elektrochemicznym trawieniem [3,6].

Powłoki fosforanowo-wapniowe, w tym hydroksyapatytowe, mogą być osadzone metodą mineralizacji w płynach symulujących środowisko tkanek, zol-żel, natryskiwania termicznego, biomimetycznego lub elektrochemicznego [7-9]. Wytrzymałość połączenia powłok Ca-P–metaliczne podłoże jest stosunkowo słaba. Może być jednak podwyższona poprzez osadzenie powłok na porowate podłoże. Pory stanowią punkty kotwiczenia dla powłoki.

Materiały i metody

Stop Ti-6Al-4V wytworzono za pomocą procesu mechanicznej syntezy, prasowania i spiekania. Porowata warstwa wierzchnia o polepszonej biogodności została wytworzona dwuetapowo: poprzez elektrochemiczne trawienie w 1 M H_3PO_4 + 2% HF w 10 V przez 30 min i osadzenie powłoki Ca-P w -1,5 V przez 1 h w wodnym roztworze 0,04 M $Ca(NO_3)_2$ + 0,025 M $(NH_4)_2HPO_4$ + 0,1 M HCl. Zarówno proces wytwarzania stopu, jak i obróbka powierzchniowa są opisane w poprzedniej publikacji [6].

Przekrój poprzeczny próbki po trawieniu wykonano poprzez przecięcie na pile diamentowej i następnie szlifowanie na papierach ściernych (gradacja 320-2000) i polerowanie na zawieszinie Al_2O_3 . Zdjęcia przekrojów posłużyły do pomiarów grubości natrawionej warstwy.

Badanie wytrzymałości połączenia Ca-P/metaliczne podłoże przeprowadzono według normy ASTM F1147-05. Próbkę z naniesioną powłoką i przeciwpróbka zostały połączone klejem na bazie żywicy epoksydowej Bison Epoxy (Bison International B.V.) i pozostawione do całkowitego związania na powietrzu przez 2 godziny. Aby zmierzyć średnią wartość wytrzymałości przygotowano 10 próbek. Jako materiał porównawczy wykorzystano stop z powierzchnią polerowaną mechanicznie (również 10 próbek). Morfologię powierzchni badano za pomocą mikroskopu SEM – napięcie przyspieszające: 15 kV.

Badania korozyjne przeprowadzono w płynie Hank (HBSS) symulującym środowisko tkanek i zawierającym: KCl 400 mg/dm³, KH_2PO_4 60 mg/dm³, NaCl 8000 mg/dm³, $NaHCO_3$ 350 mg/dm³, $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 90 mg/dm³, glukoza 1000 mg/dm³. Badania prowadzono z wykorzystaniem potencjostatu pracującego w trybie potencjodynamicznym z szybkością skanowania 0,5 mV/s i w temperaturze 37°C w komorze korozyjnej EG&G K0047.

Testy biogodności in vitro prowadzono w warunkach statycznych. Próbki przygotowane do badań miały kształt dysków. Po sterylizacji ($T = 120^\circ C$, $t = 15$ min) zostały umieszczone osobno na 24 dołkowej płytce hodowlanej. Komórki z hodowli ludzkich osteoblastów (Normal Human Osteoblast – NHOst firmy Lonza) naniesiono na każdy z dysków w ilości po 5000 komórek na dołek w 1 ml medium hodowlanego. Hodowlę prowadzono w temperaturze $T = 37^\circ C$ w atmosferze zawierającej 5% CO_2 w inkubatorze przez 1 i 5 dni. Po tym czasie próbki zostały utrwalone 25% aldehydem glutarowym i zabarwione odczynnikiem Giemsa w czasie po 10 min. Następnie próbki zostały napyłone złotem i poddane obserwacjom na mikroskopie SEM.

The porous/rough surface of implants can be prepared by conventional sand blasting, foaming process (which also results in pore formation in the whole volume of the material), as well as electrochemical etching [3,6].

Calcium-phosphates, including hydroxyapatite, can be deposited using processes of mineralization in SBF, sputtering, sol-gel, laser deposition, thermal spraying, biomimetic or cathodic electrochemical deposition [7-9]. The adhesion of the Ca-P to the metallic surface is relatively poor and can be substantially improved by deposition on a rough surface. The pores are the anchoring points for the ceramic coating [10].

Materials and Methods

For the preparation of the Ti-6Al-4V alloy mechanical alloying was applied, followed by pressing and sintering. The porous bioactive surface was produced in two steps of electrochemical treatment: anodic oxidation in 1 M H_3PO_4 + 2% HF electrolyte at 10 V for 30 min and subsequent cathodic Ca-P layer deposition at -1.5 V for 1 h, using a solution mixture of 0.042 M $Ca(NO_3)_2$ + 0.025 M $(NH_4)_2HPO_4$ + 0.1 M HCl. Both, alloy preparation and surface modification processes, were described in details elsewhere [6].

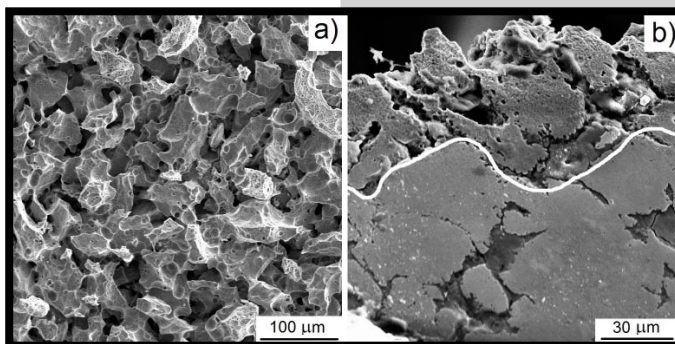
Cross-section sample preparation of samples after anodic treatment was done by cutting using a diamond saw and subsequent grinding and polishing using waterproof paper (320-2000 grit) and Al_2O_3 abrasive respectively. On the cross-section SEM images, a thickness of porous layer was measured.

The bond strength between the Ca-P coating and metallic substrate was measured using a standard bonding test (ASTM F1147-05). The coated specimen and specimen with uncoated surface were bonded using bonding glue Bison Epoxy (Bison International B.V.) based on epoxy resin, and kept stationary in air for 2 h. Ten samples were measured to obtain the average bond strength. Mechanically polished alloy was used as a reference material (also ten samples). Surface morphology after tests was investigated by scanning electron microscopy (SEM) – working potential: 15 kV.

The corrosion tests of the as-prepared materials were performed in Hank's Balanced Salt Solution (Lonza) (simulated body fluid with composition: KCl 400 mg/dm³, KH_2PO_4 60 mg/dm³, NaCl 8000 mg/dm³, $NaHCO_3$ 350 mg/dm³, $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 90 mg/dm³, Glucose 1000 mg/dm³) using a potentiostat working in a potentiodynamic mode with a scan rate of 0.5 mV/s at 37°C. The corrosion test was run in an EG&G K0047 corrosion cell.

In vitro biocompatibility tests were performed in static conditions. For these tests the discs of Ti-6Al-4V alloy were used. The discs were sterilised by autoclaving at 120°C for 15 min and were separately located at the bottom of 24-well microplates. Normal Human Osteoblast (NHOst) cells from Lonza (CC-2538) were cultured onto each disk at a concentration of 5000 cells/well in 1 ml culture medium. The cells were cultured at 37°C in 5% CO_2 incubator for 1 and 5 days. Then the cells were fixed by 25% glutaraldehyde solution for 10 min and stained by 10% Giemsa's staining solution for 10 min. The specimens were gold sputter-coated and observed by SEM.

W pracy przedstawiono wyniki badań nad ultradrobnoziarnistym stopem Ti-6Al-4V wytworzonym za pomocą procesu mechanicznej syntezy, prasowania i spiekania. Na powierzchni stopu wytworzono warstwę porowatą za pomocą elektrochemicznego trawienia w bazie kwasu fosforowego. Ultradrobnoziarnista struktura materiału ułatwiała proces trawienia, co zaowocowało szerokim przedziałem wielkości porów (od 3 nm do ok. 60 μm) [6]. Po trawieniu gęstość materiału wynosiła ok. 80% gęstości litego odpowiednika. Morfologię powierzchni po



RYS. 1. Morfologia powierzchni stopu po trawieniu elektrochemicznym - a) i przekrój poprzeczny porowatej warstwy - b) [6].

FIG. 1. Surface morphology of the alloy after electrochemical etching - a) and porous layer cross section - b); a white line shows the thickness of the etched layer [6].

trawieniu przedstawiono na RYS. 1. Na RYS. 1b przedstawiono przekrój poprzeczny natrawionej warstwy. Jej grubość wynosi ok. 45 μm . Osadzona elektrochemicznie powłoka Ca-P w -1,5 V przez 1 h jest równomierna i jednorodna z wyraźnymi pęknięciami i nierównościami na powierzchni. Pomimo pęknięć powłoka pokrywa całkowicie metaliczne podłoże. Porowatość powierzchni po osadzeniu powłoki Ca-P oszacowano na 22% [6].

Badanie wytrzymałości połączenia przeprowadzono w próbie rozciągania, a wyniki przedstawiono na RYS. 2d. Powłoka osadzona na porowatym podłożu wykazywała zdecydowanie większą przyczepność (18 MPa) niż ta osadzona na podłożu płaskim (polerowanym – 11 MPa). Porównując te wyniki z zawartymi w innych publikacjach można stwierdzić, że osiągnięto dobre rezultaty. Oh i współpracownicy osadzali hydroksyapatyt na porowatym tytanie i uzyskali wytrzymałość połączenia na poziomie 7 MPa [10]. Z kolei Chen z zespołem pokazali, że powłoki Ca-P osadzane na tytanie metodą biomimetyczną z SBF wytrzymują naprężenia rzędu 15,5 MPa [5]. Zdjęcia SEM powierzchni po zniszczeniu i schematycznie pokazany charakter mechanizmu zniszczenia przedstawiono na RYS. 2a-c i 3. Zarówno na próbce płaskiej jak i porowatej można zaobserwować dwa rodzaje zniszczenia: adhezyjne i kohezyjne. Zniszczenie adhezyjne ma miejsce gdy zerwanie następuje na granicy powłoka/metaliczne podłoże. Jeśli natomiast zniszczenie nastąpi w obszarze powłoki wówczas mamy do czynienia ze zniszczeniem kohezyjnym.

Dla próbki porowatej zniszczenie miało charakter adhezyjno-kohezyjny. Na RYS. 2a i b widać jasne obszary Ca-P. Wiązanie powłoki z podłożem w miejscach porów jest znacznie silniejsze niż na relatywnie płaskich obszarach. Pory stanowią miejsca kotwiczenia powłoki ceramicznej. Zniszczenie na próbce płaskiej (nieporowatej) miało miejsce głównie na granicy powłoka/podłoże. Wytrzymałość połączenia w tym przypadku odpowiada sile adhezji Ca-P do metalicznego podłoża (RYS. 3).

Odporność korozyjna jest jednym z najważniejszych czynników mających decydujący wpływ na zastosowanie danego materiału na implanty. Badania korozyjne przeprowadzono metodą potencjodynamiczną w płynie Hanka (HBSS) symulującym środowisko tkanek i zawierającym znaczną ilość chlorków. Wyniki zestawiono w TABELI 1 i na RYS. 4. Parametry korozyjne (potencjał i gęstość prądu korozyjnego) wyznaczono na podstawie ekstrapolacji Tafelowskiej. Wykorzystano do tego oprogramowanie CorrWare i CorrView.

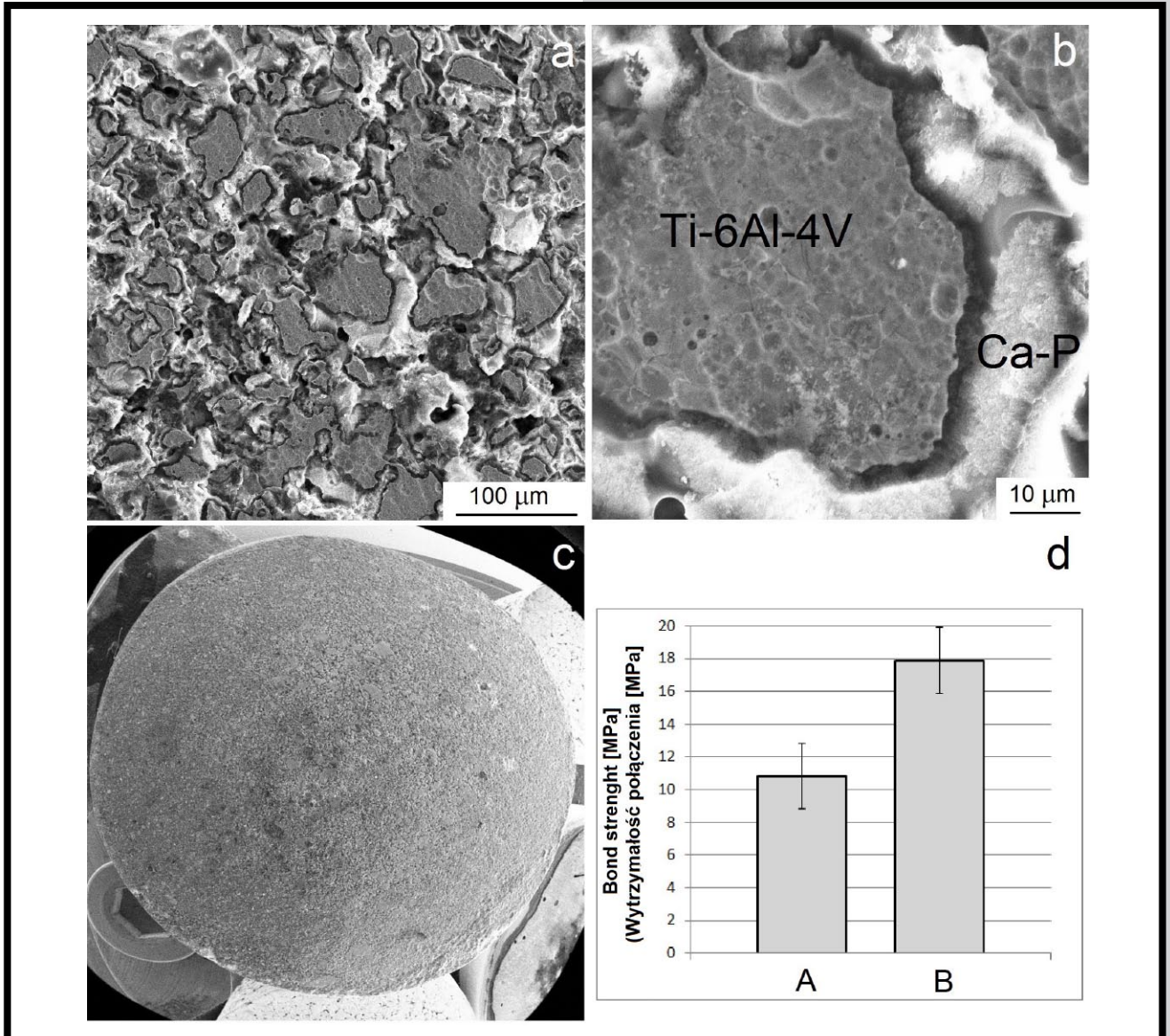
In this work, ultrafine grained Ti-6Al-4V alloy (grain size distribution: 0-200 nm – 24%, 201-400 nm – 42%, 401-600 nm – 25%, 601-800 nm – 6%, 801-1000 nm – 3%) was prepared by mechanical alloying, pressing and sintering. Roughening was done by anodic electrochemical etching in phosphoric acid solution. The ultrafine structure of the sinters improves the etching process. The etched surface is very rough with pore diameters in the range of 3 nm to 60 μm . After etching, the compacts achieved densities of about 80% of the bulk ingots. The

surface morphology of the alloy after electrochemical etching is shown in FIG. 1a. The sinter, due to a large volume of the grain boundaries was easily etched and hence this specific morphology was obtained. In FIG. 1b a cross section of the porous layer is shown. The thickness of the porous layer was about 45 μm . Depositing of Ca-P compounds at -1.5 V for 1 h led to homogenous and continuous coatings, but with some cracks inside and rugged particles, which lay on the surface. The coating was slightly cracked, but it fully covered the metallic substrate. The surface porosity after Ca-P deposition was estimated at 22% [6].

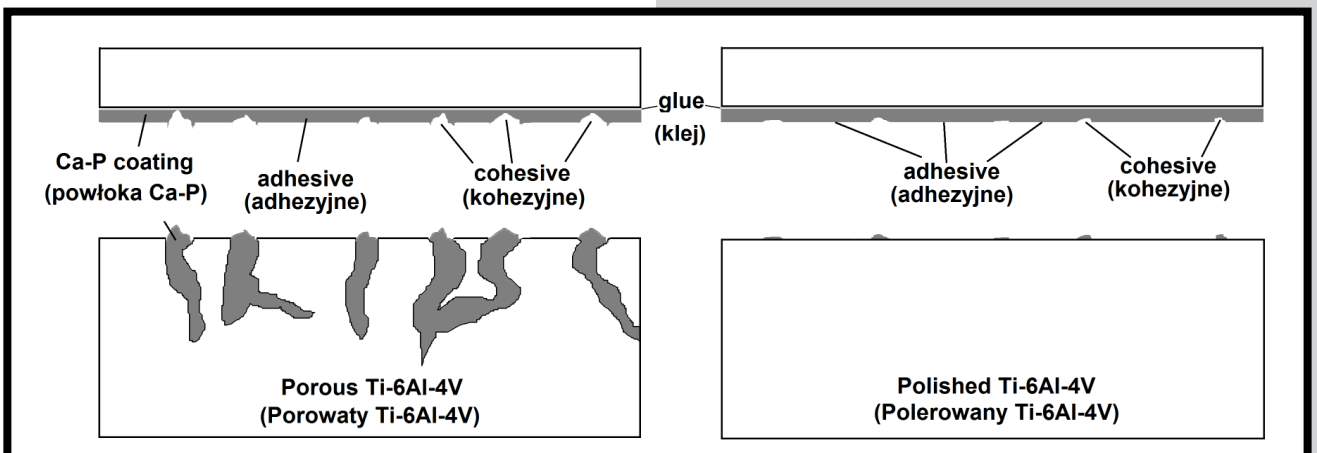
The bond strength obtained by a tensile test is shown in FIG. 2d. The Ca-P coating showed higher strength (18 MPa) to the porous Ti-6Al-4V substrate than to the bulk flat surface (11 MPa). This is a very good result compared to other authors. Oh et al. prepared HA layers on porous Ti substrates with bond strengths about 7 MPa [10], and Chen et al. showed that Ca-P coatings deposited on Ti substrates by a biomimetic method from SBF could present bond strengths of approximately 15.5 MPa [5]. SEM micrographs of failure surfaces and schematic illustrations of an interface after the test are shown in FIG. 2a, b, c and FIG. 3, respectively. On both, porous and bulk substrates two types of failure mode: adhesive and cohesive were observed. The adhesive strength of the coating is given if failure is entirely at the coating/substrate interface, and the cohesive strength of the coating is given if failure is only within the coating.

For the porous substrate the bond strength corresponded to adhesive/cohesive strength. In FIG. 2a and b there are well visible Ca-P areas. The fixation of the coating in pores is much stronger than on the relatively flat surface. The pores appeared to be the anchoring points for the ceramic coating. The failure of Ca-P on the bulk substrate occurred almost totally at the alloy/ceramic interface. The bond strength in this case corresponded mainly to adhesive strength (FIG. 3).

The corrosion resistance of the biomaterial is a very important factor, which can decide about application of the material in the aggressive human body environment. The corrosion resistance was investigated in simulated body fluid – HBSS consisting to significant amount of chloride, using a potentiodynamic method. The results are shown in FIG. 4 and in TABLE 1. The corrosion current density I_{corr} and corrosion potential E_{corr} (TABLE 1) were estimated on the base of corrosion curves by Tafel extrapolation methods using CorrWare and CorrView software.



RYS. 2. Zdjęcia SEM powierzchni po testach wytrzymałościowych: a, b – różne powiększenia, c – tryb rybie oko, d – wytrzymałość połączenia: A – próbka polerowana, B – próbka porowata.
 FIG. 2. SEM micrographs of failure surfaces: a, b – different magnification, c – fish-eye image, d – bond strength: A – polished sample, B – porous sample.

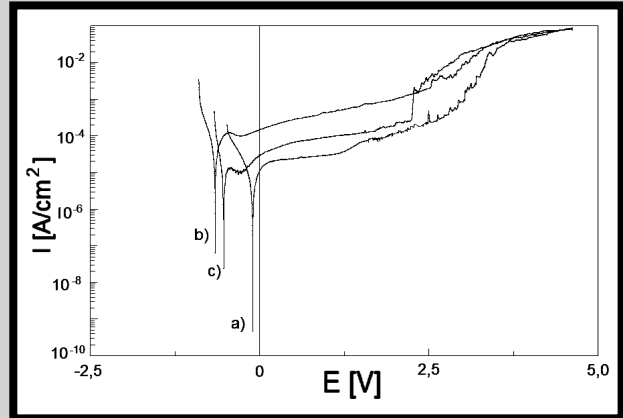


RYS. 3. Schemat granicy rozdziału po próbie rozciągania połączenia powłoka Ca-P/stop Ti-6Al-4V dla próbki porowatej i polerowanej.
 FIG. 3. Schematic illustrations of a Ca-P/Ti-6Al-4V alloy interface cross-section after tensile test for porous and polished Ti-6Al-4V.

TABELA 1. Gęstość prądu korozyjnego I_{corr} i potencjał korozyjny E_{corr} stopu Ti-6Al-4V przed i po trawieniu elektrochemicznym (1M H_3PO_4 + 2% HF; 10 V / 30 min) oraz po osadzeniu Ca-P.
TABLE 1. Corrosion current density I_{corr} and corrosion potential E_{corr} of the Ti-6Al-4V alloy before and after electrochemical etching (1M H_3PO_4 + 2% HF; 10 V / 30 min) and after additional Ca-P deposition.

Materiał Material	I_{corr} [A/cm ²]	E_{corr} [V]
Ti-6Al-4V polerowany mechanicznie Ti-6Al-4V mechanically polished	1.86 ± 0.63 $\times 10^{-6}$	-0.10 ± 0.01
Ti-6Al-4V po trawieniu Ti-6Al-4V after etching	2.83 ± 0.51 $\times 10^{-5}$	-0.66 ± 0.02
Ti-6Al-4V po osadzeniu Ca-P Ti-6Al-4V after etching + Ca-P	9.52 ± 0.81 $\times 10^{-6}$	-0.53 ± 0.01

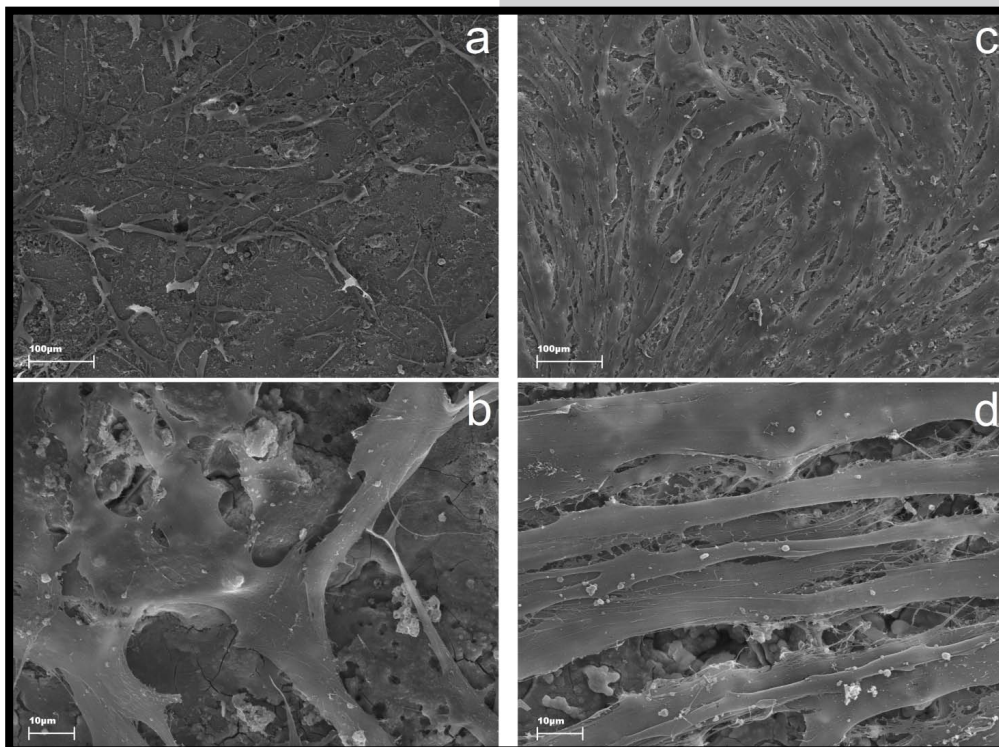
Na podstawie krzywych polaryzacji wyraźnie widać, że proces trawienia stopu Ti-6Al-4V powoduje podwyższenie gęstości prądu korozyjnego (na skutek zwiększenia porowatości) i przesunięcie potencjału w kierunku ujemnych wartości. Osadzenie ceramicznej powłoki na wcześniej natrawionej powierzchni skutkuje spadkiem gęstości prądu o jeden rząd wielkości. Ceramika Ca-P jest izolatorem, więc parametry korozyjne powinny być lepsze dla próbek z tą powłoką niż bez niej, aczkolwiek powłoka ta jest również porowata i w niektórych miejscach może nie przylegać ściśle do podłoża. W związku z tym obserwuje się jedynie niewielką poprawę parametrów korozyjnych w stosunku do próbki nieporowatej (polerowanej mechanicznie). Badania prowadzono w stosunkowo szerokim zakresie potencjałów celem zarejestrowania potencjału transpasywacji. Na wszystkich krzywych można zaobserwować szeroki zakres pasywny.



RYS. 4. Krzywe korozyjne dla stopu Ti-6Al-4V: a) polerowanego mechanicznie, b) po trawieniu, c) po osadzeniu Ca-P.

FIG. 4. The polarization corrosion curves for Ti-6Al-4V samples: a) mechanically polished, b) after etching, c) after etching and Ca-P deposition.

The polarization curves clearly show that the etching process of Ti-6Al-4V resulted in increasing corrosion current (because of increasing porosity) and shift of the corrosion potential to more negative values. The subsequent Ca-P deposition led to a decrease of the corrosion current by one order of magnitude. The Ca-P ceramic is an insulator, so the corrosion current density should be lower on samples with deposited Ca-P coating, than on the samples without Ca-P, but the layer was not ideally flat, with pits inside, resulting in corrosion deterioration. Therefore, there was only slight improvement of the corrosion current density compared to polished samples. The tests were done in relatively wide range to observe transpassivation potentials. All curves showed relatively wide passive areas.



RYS. 5. Obrazy morfologii hodowli osteoblastów po 1 dniu – a), b) i 5 dniach – c), d) na powierzchni stopu Ti-6Al-4V po trawieniu i osadzeniu Ca-P.

FIG. 5. Osteoblast culture after 1st day – a), b) and 5th day – c), d) on the surface Ti-6Al-4V after etching and additional Ca-P deposition.

Obrazy SEM morfologii ludzkich osteoblastów na stopie Ti-6Al-4V trawionego i z osadzoną powłoką Ca-P w potencjale -1,5 V po jednym i pięciu dniach hodowli pokazano na RYS. 5. Po tym czasie zaobserwowano największe różnice. Po pierwszym dniu inkubacji komórki wykazywały normalny poziom aktywności – na RYS. 5a i b widoczne są liczne filopodia, co świadczy o dobrej adhezji do powierzchni. Po pięciu dniach inkubacji można zaobserwować zwartą warstwę utworzoną z komórek pokrywającą całą badaną powierzchnię próbki (tzw. monowarstwę). Generalnie zachowanie się komórek, ich rozwój i proliferacja zależą od topografii powierzchni. Przeprowadzona elektrochemiczna obróbka stopu Ti-6Al-4V poprawia warunki dla adhezji i proliferacji osteoblastów.

Wnioski

W pracy przedstawiono właściwości ultradrobnociarnego stopu Ti-6Al-4V z elektrochemicznie zmodyfikowaną powierzchnią. Pierwszym etapem obróbki było elektrochemiczne trawienie, a drugim osadzenie powłoki Ca-P. Wynikiem tej obróbki jest silnie porowata warstwa wierzchnia. Modyfikacja powierzchni nieznacznie poprawia wartość gęstości prądu korozyjnego stopu. Elektrochemicznie obrobiona powierzchnia (po trawieniu i osadzeniu Ca-P) wspomaga wzrost i proliferację osteoblastów. Powierzchnia stopu po trawieniu stanowi dobre podłoże do osadzania powłok bioceramicznych. Wytrzymałość połączenia metal/ceramika jest w tym przypadku o ponad 50% większa niż dla nieporowatego odpowiednika.

Wytworzony stop ze zmodyfikowaną powierzchnią wykazuje dobre właściwości pod kątem jego zastosowań na implanty tkanek twardych.

Podziękowania

Badania prowadzone były w ramach działalności statutowej.

The SEM images of the osteoblast cells cultured on the surface of the Ti-6Al-4V discs after Ca-P deposition at -1.5 V sterilised by autoclaving after 1 and 5 days are shown in FIG. 5. Significant differences were observed in osteoblast culture on respective samples after 1 and 5 days. After the 1st day of incubation cells showed good adhesion to the surface of the studied sample in the form of filopodia (FIG. 5a, b). This indicated that the cells showed a normal level of activity. A compact cell layer was formed on the top of the samples after 5 days of incubation (FIG. 5c, d). Based on these observations, it seems that the osteoblast culture evolves in the following stages: cell colonization and multilayering. Generally, cells' attachment and proliferation depend on the surface topography and roughness. After culture for 5 days the surface of the porous Ti-6Al-4V discs was covered by a monolayer of flat, spread cells (FIG. 5c). The electrochemical biofunctionalization improved osteoblast adhesion and proliferation.

Conclusions

In this work we showed properties of porous ultrafine grained Ti-6Al-4V alloy with electrochemically modified surfaces. On the etched surface a bioactive ceramic Ca-P layer was deposited. Both, etching and layer deposition improved the porosity of the surface. A Ti-6Al-4V porous surface is a good base for Ca-P deposition by electrochemical methods. The bond strength obtained by a tensile test showed more than 50% higher strength to the porous Ti-6Al-4V substrate than to the bulk. Surface modification only slightly improved the corrosion current density and it did not cause a considerable improvement of the corrosion resistance. We showed that the rough, electrochemically biofunctionalized surface (porous with Ca-P layer) supported osteoblast cell growth and proliferation.

The prepared ultrafine grained Ti-6Al-4V alloy with modified surface showed positive properties for hard tissue engineering applications.

Acknowledgments

This work was carried out within the statutory activity of the Institute of Materials Science and Engineering, Poznan University of Technology.

Piśmiennictwo

- [1] Hsu R.W.-W., Yang Ch.-Ch., Huang Ch.-A., Chen Y.-S.: Electrochemical corrosion properties of Ti-6Al-4V implant alloy in the biological environment. *Materials Science and Engineering A* 380 (2004) 100-109.
- [2] Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Iost A., Leroy J.M.: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 21 (2000) 1567-1577.
- [3] Jakubowicz J., Adamek G.: Preparation and properties of mechanically alloyed and electrochemically etched porous Ti-6Al-4V. *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 1772-1775.
- [4] Lugowski S.J., Smith D.C., McHugh A.D., Van Loon J.C.: Release of metal ions from dental implant materials in vivo: Determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue. *Journal of Biomedical Materials Research* 25 (1991) 1443-1458.
- [5] Chen X., Li Y., D. Hodgson P.D., Wen C.: Microstructures and bond strengths of the calcium phosphate coatings formed on titanium from different simulated body fluids. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 165-171.

References

- [6] Adamek G., Jakubowicz J.: Mechano-electrochemical synthesis and properties of porous nano-Ti-6Al-4V alloy with hydroxyapatite layer for biomedical applications. *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 653-656.
- [7] Das K., Bose S., Bandyopadhyay A.: Surface modifications and cell-materials interactions with anodized Ti. *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 573-585.
- [8] Gu Y.W., Khor K.A., Cheang P.: Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS). *Biomaterials* 25 (2004) 4127-4134.
- [9] Gu Y.W., Tay B.Y., Lim C.S., Yong M.S.: Biomimetic deposition of apatite coating on surface-modified NiTi alloy. *Biomaterials* 34 (2005) 6916-6923.
- [10] Oh I-H., Nomura N., Chiba A., Murayama Y.: Microstructures and bond strengths of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on porous titanium substrates. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16 (2005) 635-640.

EFEKTY UTLENIANIA TYTANU PO RÓŻNYCH METODACH MODYFIKACJI POWIERZCHNI

JÓZEF JASIŃSKI, MAŁGORZATA LUBAS*,
JAROSŁAW JASIŃSKI, PAWEŁ WIECZOREK

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZĘSTOCHOWA

* E-MAIL: MLUBAS@WIP.PCZ.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono analizę topografii powierzchni tytanu Grade 2 po obróbce mechanicznej (szlifowanie i piaskowanie) oraz wpływ aktywacji powierzchni na właściwości warstwy po procesie utleniania w złożu w temperaturze 610°C i czasie 6, 8 i 12 godzin. Do badań topografii powierzchni oraz analizy adhezji zastosowano metodę AFM i scratch test, natomiast strukturę i zmiany składu fazowego badano z zastosowaniem metody SEM-EDS i XRD. Badania topografii powierzchni tytanu Grade 2 przed procesem utleniania potwierdziły, że przeprowadzona aktywacja powierzchni z wykorzystaniem medium piaskującego w postaci Al_2O_3 korzystnie wpływa na zwiększenie chropowatości oraz poprawę stanu powierzchni tytanu po procesie utleniania szczególnie w czasie 8 godzin. Stwierdzono również, że zastosowanie złoża fluidalnego do procesów utleniania tytanu pozwala na otrzymanie jednorodnych powłok tlenkowych o dobrej adhezji z podłożem, a tym samym poprawę właściwości powierzchni tytanu w aspekcie zastosowań biomedycznych.

Słowa kluczowe: obróbka powierzchniowa (szlifowanie i polerowanie), utlenienie tytanu, złożo fluidalne, chropowatość powierzchni

[Inżynieria Biomateriałów 120 (2013) 41-47]

Wstęp

Tytan i jego stopy to powszechnie stosowane materiały do wytwarzania implantów m.in.: w ortopedii, kardiochirurgii i stomatologii. Materiały te charakteryzuje przede wszystkim dobra odporność korozyjna i właściwości wytrzymałościowe, przy niskim ciężarze właściwym. Należy jednak pamiętać, że znajomość właściwości mechanicznych trzeba rozważać w aspekcie roli fizjologicznej, jaką spełnia dany biomateriał [1]. Bardzo ważną rolę w przypadku biomateriałów metalicznych odgrywa również powierzchnia materiału. Jakość powierzchni implantu jest bardzo ważna w procesie osseointegracji, regeneracji tkanek miękkich, jak również zachowania się implantu w czasie eksploatacji. Prace naukowe potwierdzają, że odbudowa kości jest silnie związana z powierzchnią implantu, jej zdefektowaniem oraz morfologią. Bardzo ważny zatem jest stan powierzchni implantów w trakcie leczenia, ze względu na możliwość kontrolowania regeneracji tkanek oraz właściwości implantu. Stosując różne techniki badawcze, naukowcy wykazali w badaniach in vivo, że chropowatość powierzchni materiału ma znaczący wpływ na odpowiedź biologiczną implantów z tytanu i jego stopów.

TITANIUM OXIDATION EFFECTS AFTER VARIOUS SURFACE MODIFICATION METHODS

JÓZEF JASIŃSKI, MAŁGORZATA LUBAS*,
JAROSŁAW JASIŃSKI, PAWEŁ WIECZOREK

CZESTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE,
ARMII KRAJOWEJ AV. 19, 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND

* E-MAIL: MLUBAS@WIP.PCZ.PL

Abstract

The paper presents an analysis of titanium grade 2 surface topography after surface treatment (grinding and sandblasting) and the influence of surface activating on the properties of the surface layer after the oxidation process in a Al_2O_3 fluidized bed, at 610°C and for 6, 8 and 12 hours. AFM and scratch test methods were used for surface topography and layer adhesion analysis, while SEM-EDX and XRD methods were used to examine the microstructure and changes in phase composition. Studies of Grade 2 titanium surface topography before oxidation confirmed that the surface activation carried out using the Al_2O_3 blasting medium increases the roughness and improves the state of titanium surface after oxidation, especially after 8 h. The results also showed that using of a fluidized bed for titanium oxidation allows to obtain uniform oxide layers for biomedical applications.

Keywords: surface treatment (grinding and sandblasting), titanium oxidation, fluidized bed, surface roughness

[Engineering of Biomaterials 120 (2013) 41-47]

Introduction

Titanium and its alloys are widely used for the production of implants, for example: in orthopaedics, cardiosurgery and dentistry. These materials are primarily characterized by good corrosion resistance and good mechanical properties in relation to their density. However, it should be noted that mechanical properties need to be considered in terms of the physiological role that the biomaterial (implant) fulfils [1]. A very important role in the case of metallic biomaterials is also played by the surface. The quality of implant surface is crucial for the process of osseointegration and soft tissue regeneration and also affects the behavior of the implant during use. Scientific research confirms that bone reconstruction is strongly related to implant surface properties and presence of defects. Therefore, implant surface condition is significant in the process of treatment, due to the possibility of controlling tissue repair and implant properties. Using a variety of research techniques, scientists have demonstrated in vivo that the roughness of the material surface has a major impact on the biological response to implants made of titanium and its alloys. They have also shown enhanced adhesion of osteoblast on titanium with highly developed surface, while fibroblasts and epithelial cells preferentially adhered on smooth implant surfaces [2,3].

Wykazały one również, że występuje większe prawdopodobieństwo przylegania osteoblastów do powierzchni tytanu o znacznym rozwinięciu, natomiast fibroblasty i komórki nabłonkowe wykazują większą adhezję do gładkich powierzchniach implantów [2,3]. Chropowata powierzchnia jest zatem funkcjonalna ze względu na lepszy wzrost tkanki kostnej na powierzchni implantu, a tym samym stwarza warunki do poprawy jej przyczepności do implantu. Dane literaturowe nie przedstawiają jednak optymalnej, ściśle określonej wartości chropowatości powierzchni dla implantów metalicznych, która jest wymagana do najkorzystniejszych warunków regeneracji tkanek [4,5]. Jedną z nowoczesnych metod stosowanych do analizy topografii powierzchni jest mikroskopia sił atomowych. Autorzy przedstawili wyniki badań stanu powierzchni próbek tytanu implantów z zastosowaniem tej techniki. W pracy wykazano, że chropowatość powierzchni zależy w znacznym stopniu od zastosowanej metody aktywacji powierzchni, co sugeruje, że powierzchnia, często pomijana w badaniach implantów, jest bardzo ważna dla oceny ich charakterystyki i właściwości [6]. Przedstawiono również analizę stanu powierzchni tytanu po utlenieniu z zastosowaniem różnych metod obróbki powierzchniowej przed procesem tj. szlifowaniem i piaskowaniem z zastosowaniem Al_2O_3 . Utlenianie tytanu zastosowano jako podstawową obróbkę cieplno-chemiczną, w celu uzyskania ochronnych warstw tlenkowych TiO_2 o dobrej adhezji do podłoża.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono stosując próbki tytanu Grade 2 o wymiarach 30x15x2 mm, przed i po powierzchniowej obróbce mechanicznej: piaskowaniu i szlifowaniu. Następnie na próbkach wytworzono warstwy tlenkowe TiO_x z zastosowaniem złoża fluidalnego z materiałem ziarnistym w postaci Al_2O_3 . Proces przeprowadzono dla dwóch serii próbek: seria 1 – próbka szlifowana na papierze o gradacji ≤ 1000 , seria 2 – próbka piaskowana Al_2O_3 o uziarnieniu 110 μm . Próbkę po aktywacji mechanicznej utleniano w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C, w czasie 6, 8 i 12 godzin i atmosferze powietrza. Próbkę zarówno przed, jak i po procesie obróbki mechanicznej i cieplnej były odtłuszczone i czyszczone w myjce ultradźwiękowej w roztworze aceton + alkohol etylowy + woda w czasie 10 min. Do badań topografii powierzchni po poszczególnych procesach aktywacji i obróbce cieplnej zastosowano mikroskop sił atomowych MULTI MODE NANOSCOPE V VEECO. Analizowany obszar skanowania wynosił 10 μm x 10 μm . Wiadomo bowiem na podstawie danych literaturowych, że chropowatość zależna jest także od obszaru skanowania [7]. Wyznaczono również podstawowe parametry chropowatości (R_a , R_q) i określono wpływ obróbki mechanicznej i cieplnej na stan powierzchni. Badania scratch test wykonano z zastosowaniem urządzenia CSEM REVETEST w zakresie obciążeń 0÷10 N. Zmiany składu fazowego przeprowadzono z zastosowaniem rentgenowskiej analizy fazowej przy użyciu dyfraktometru rentgenowskiego SEIFERT XRD 3003, stosując promieniowanie, $Co K_{\alpha}$, natomiast badania SEM-EDS przeprowadzono z zastosowaniem mikroskopu JOEL JSM-6610 LV z mikroanalizatorem EDS firmy Oxford Instruments.

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie wykonano rentgenowską analizę fazową próbek tytanu po procesie szlifowania oraz piaskowania zaprezentowaną na RYS. 1. Następnie powierzchnię próbek o wymiarach 10 mm x 5 mm skanowano przy użyciu mikroskopu sił atomowych w obszarze 10 μm x 10 μm . Uzyskane wyniki przedstawiono na RYS. 2.

A rough surface is therefore functional due to a better growth of bone tissue on implant surface, thus it creates the conditions for improving tissue adhesion to the implant. However, the literature does not present the optimal strictly-defined surface roughness values for metal implants which is required for the regeneration of tissues [4,5]. One of the modern methods used to analyze surface topography is atomic force microscopy. The authors present the results of titanium surface analysis using this method. The paper confirms that surface roughness depends significantly on its activation method, and this parameter is also very important for the evaluation of the surface characteristics and properties [6]. The paper also presents an analysis of titanium surface after oxidation treatment in order to obtain protective oxide layers of TiO_2 having good adhesion to the substrate.

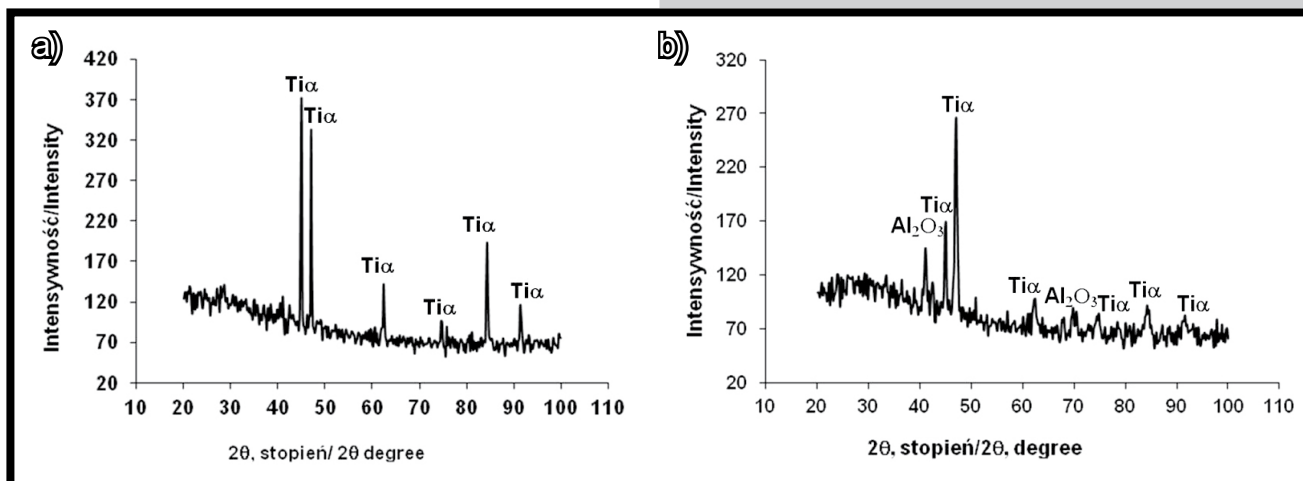
Materials and Methods

The research was conducted using Grade 2 titanium samples (30x15x2 mm) before and after surface sand blasting and grinding. TiO_x oxide layers were formed using a fluidized bed with Al_2O_3 as a grain material. The process was realized for two series of samples: series 1 - sample ground with SiC paper grit ≤ 1000 , series 2 - sample blasted with Al_2O_3 , grain size 110 μm . The samples were oxidized after mechanical activation in a fluidized bed at 610°C, for 6, 8 and 12 hours, in air atmosphere. The samples both before and after mechanical and thermal treatment were degreased and ultrasonically cleaned in acetone, ethanol and water for 10 min. In order to analyse surface topography after each activation process and after thermal treatment, the atomic force microscope VEECO MULTIMODE AFM with a nanoscope controller was used. The analyzed scan area was 10 μm x 10 μm . It is also known from the literature that roughness is dependant on scan area [7]. Roughness parameters (R_a , R_q) were measured, and the influence of mechanical and thermal treatment on surface condition was also identified. Scratch tests were realized using CSEM REVETEST tester with test load in the range between 0÷10 N. Phase composition evaluation were followed out using XRD method with the SEIFERT XRD 3003 diffractometer with $Co K_{\alpha}$ radiation and SEM-EDX investigation was carried out using JOEL JSM-6610 LV with Oxford Instruments EDX microanalyzer.

Results and Discussion

In the first stage, a phase analysis of titanium samples after grinding and sandblasting was carried out (FIG. 1). Then, the samples with size of 10 mm x 5 mm were scanned using an atomic force microscope at the area of 10 μm x 10 μm . The results are shown in FIG. 2.

The X-ray diffractogram of sample no. 1 (ground) showed the presence of reflections derived from Ti alpha. For the titanium sample after sandblasting, reflections from Al_2O_3 phase are also visible. Simultaneously, there were reductions in the intensity of the main reflections (Ti_{α}), which may indicate a change in the surface topography of the analysed titanium samples and their surface roughness. On the other hand, surface topography analyses confirmed that mechanical treatment, with the use of Al_2O_3 as a blasting medium, results in a change in the surface roughness. The main parameter related to roughness depth (R_q) for the blasted sample is 205 nm, whereas for the ground sample it is 12.2 nm. Other roughness parameters, such as the arithmetic mean of the roughness profile deviation from the centre line R_a of the ground sample is 5,37 nm, while for the sandblasted line it increases to 257 nm.

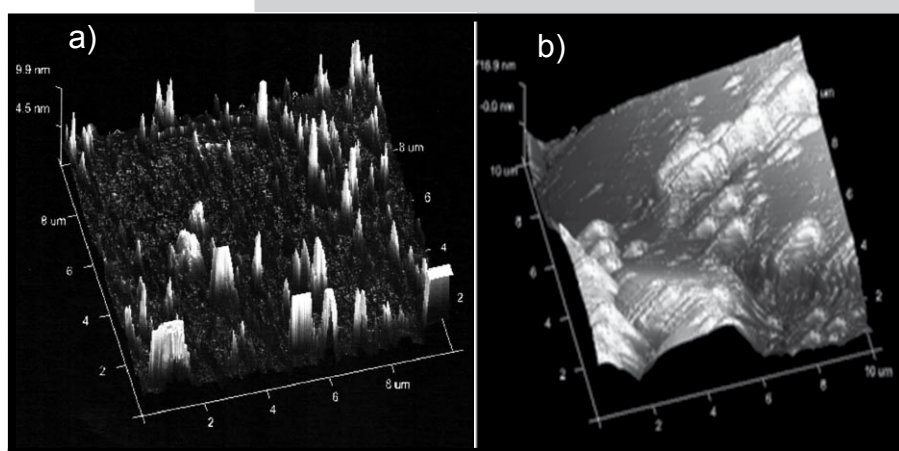


RYS. 1. Dyfraktogramy rentgenowskie tytanu Grade 2: a) po szlifowaniu, b) po piaskowaniu Al_2O_3 .
FIG. 1. Diffractograms for GRADE 2 titanium: a) after grinding, b) after Al_2O_3 sandblasting.

Dyfraktogram rentgenowski dla próbki nr 1 (szlifowana) ujawnił obecność refleksów pochodzących od tytanu (Ti_α). Dla próbki tytanu po procesie piaskowania na dyfraktogramie widoczne są również refleksy pochodzące od fazy Al_2O_3 . Jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie intensywności głównych refleksów (Ti_α), co może świadczyć o zmianie stanu powierzchni analizowanych próbek tytanu i jej znacznym rozwinięciu. Z kolei badania topografii powierzchni potwierdziły, że przeprowadzona obróbka mechaniczna z zastosowaniem medium piaskującego w postaci Al_2O_3 wpływa na zmianę stanu chropowatości i aktywację powierzchni. Podstawowy parametr dotyczący wysokości nierówności (R_q) dla próbki piaskowanej wynosi 205 nm, podczas gdy dla próbki szlifowanej jest równy 12,2 nm. Pozostałe parametry chropowatości, w tym średnia arytmetyczna odchylenia profilu nierówności od linii średniej, R_a próbki szlifowanej wynosi 5,37 nm, a piaskowanej wzrasta do 257 nm.

W dalszym etapie badań określono wpływ zastosowanej mechanicznej obróbki powierzchniowej na proces utleniania tytanu w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C w czasie 6, 8 i 12 godzin. W tym celu również wykonano badania rentgenograficzne oraz przeprowadzono analizę stanu powierzchni i określono podstawowe parametry chropowatości R_a , R_q , R_{max} dla wszystkich wariantów obróbki powierzchniowej i cieplnej. Na RYS. 3 przedstawiono wyniki badań rentgenograficznych. Badania te wykazały, że dla tytanu utlenianego w złożu fluidalnym charakterystyczne jest występowanie pików pochodzących od fazy TiO_2 , co świadczy o utworzeniu przypowierzchniowych warstw tlenkowych. Ponadto zauważono niewielkie przesunięcie pików pochodzących od fazy Ti_α w stosunku do stanu wyjściowego, co z kolei należy tłumaczyć zmianą stopnia nasycenia podłoża tlenem [8].

Wyniki podstawowych parametrów chropowatości analizowanych próbek tytanu, wyznaczonych na podstawie badań topografii i morfologii powierzchni z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych zestawiono w TABELI 1.

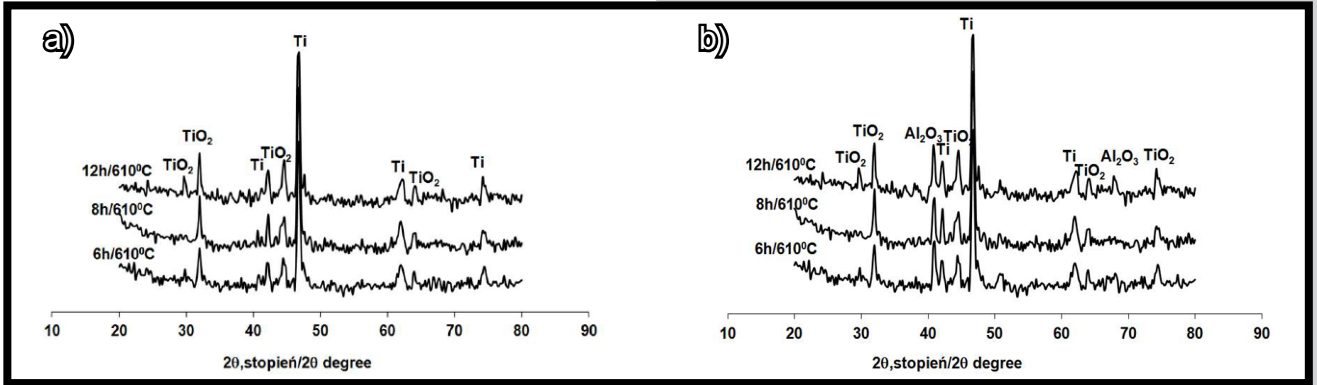


RYS. 2. Topografia powierzchni próbek tytanowych wraz z podstawowymi parametrami chropowatości: a) szlifowanej, b) piaskowanej Al_2O_3 .
FIG. 2. Surface topography of titanium samples with basic roughness parameters: a) after grinding, b) after Al_2O_3 sandblasting.

a) $R_a = 5.37 \text{ nm}$, $R_q = 12.2 \text{ nm}$, $R_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$
 b) $R_a = 257 \text{ nm}$, $R_q = 205 \text{ nm}$, $R_{\text{max}} = 1349 \text{ nm}$

In the next stage of the study, the influence of the mechanical surface treatment on titanium oxidation process in a fluidized bed at 610°C for 6, 8 and 12 hours was determined. For this purpose, XRD, SEM-EDX, surface topography and scratch test were realized. The roughness parameters R_a , R_q , R_{max} were set out for all surface treatment options and also after thermal treatment. FIG. 3 shows the results of X-ray diffraction analyses. This shows that for titanium oxidized in the fluidized bed, the oxide TiO_2 is characteristic, indicating that surface oxide layers thickness has increased. Moreover, shifting of the Ti_α peaks was observed as compared with initial state, which is linked to the increment of substrate saturation with oxygen [8].

Results of the roughness parameters of the analysed titanium samples, obtained from atomic force microscopy are shown in TABLE 1.



RYS. 3. Dyfraktogramy rentgenowskie próbek tytanu Grade 2 po utlenianiu w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C w czasie 6, 8 i 12 godzin: a) po szlifowaniu, b) po piaskowaniu.

FIG. 3. X-ray diffractograms of titanium Grade 2 samples after oxidation in a fluidized bed at the temperature of 610°C for 6, 8 and 12 hours: a) after grinding, b) after sandblasting.

Topografię powierzchni próbek tytanu Grade 2 po utlenianiu w złożu fluidalnym przedstawiono na RYS. 4 i 5.

Na podstawie obserwacji stanu powierzchni stwierdzono, że rodzaj aktywowania powierzchni przed procesem utleniania w znacznym stopniu wpływa na budowę i topografię otrzymanych powłok. Dla poszczególnych zmian parametru czasu procesu utleniania charakterystyczna jest różnica w topografii powierzchni. Po utlenianiu w czasie 6 h powierzchnia warstwy Ti po szlifowaniu posiada mniejsze parametry chropowatości od Ti po piaskowaniu, jednak topografia powierzchni (RYS. 4) wskazuje na występujące lokalne nierówności i różnice chropowatości w powłoce tlenkowej. Natomiast obserwując powierzchnię powłoki tlenkowej po utlenianiu w złożu fluidalnym w czasie 8 h zarówno po szlifowaniu i po piaskowaniu stwierdza się występowanie jednorodnej powłoki tlenkowej (RYS. 4b, 5b), co zaprezentowano na zdjęciach SEM i potwierdzono analizą składu chemicznego w mikroobszarach SEM-EDS (RYS. 6).

Dodatkowo widoczne są efekty wpływu aktywacji powierzchni na tworzenie się zwartej powłoki TiO_x szczególnie w próbce po piaskowaniu, gdzie zauważalny jest wzrost globularnych obszarów powłoki, związanych ze zmianą energii powierzchniowej próbki po piaskowaniu i dążenia układu do zmniejszenia energii w stosunku do objętości powłoki. W tym wariancie aktywacji połączonej z fluidalną obróbką powierzchniową nie występują obszary porowate oraz złuszczenia powłoki związane z jej wzrostem. Wyniki badań metodą scratch test zaprezentowane na RYS. 7 również potwierdziły, że znacznie większą adhezję do podłoża oraz właściwości mechaniczne uzyskano dla warstw TiO_x wytworzonych na podłożu piaskowanym. Obciążenie krytyczne w przypadku warstw utworzonych na podłożu szlifowanym wynosiło ok. 0,9 N, natomiast na podłożu piaskowanym ok. 1,4 N.

TABELA 1. Podstawowe parametry chropowatości dla analizowanych próbek tytanu dla różnych wariantów obróbki powierzchniowej.

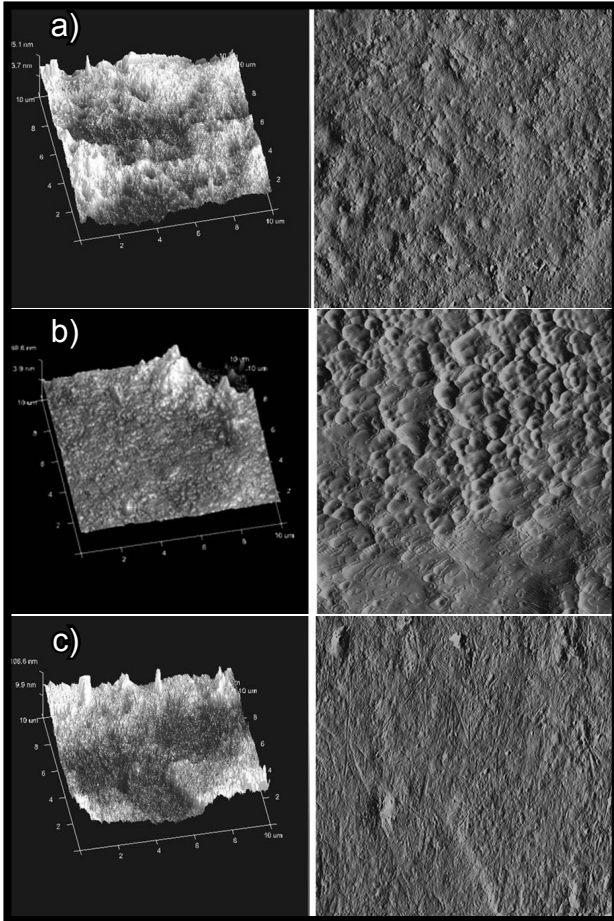
TABLE 1. Basic roughness parameters for the analysed titanium samples for different options of titanium surface treatment.

Wariant obróbki Heat treatment variant	Parametry chropowatości / Roughness parameter		
	Ra, nm	Rmax, nm	Rq, nm
Tytan Grade 2 utleniony w 610°C – po szlifowaniu Grade 2 titanium after grinding and oxidation in a fluidized bed at 610°C			
6 godz./ h	26	217	31.9
8 godz./ h	39	663	65.3
12 godz./ h	22.2	381	28.1
Tytan Grade 2 utleniony w 610°C – po piaskowaniu Grade 2 titanium after sandblasted and oxidation in a fluidized bed at 610°C			
6 godz./h	298	2032	346
8 godz./h	395	2399	473
12 godz./h	399	2830	490

Surface topography of Grade 2 titanium samples is shown in FIG. 4 and 5.

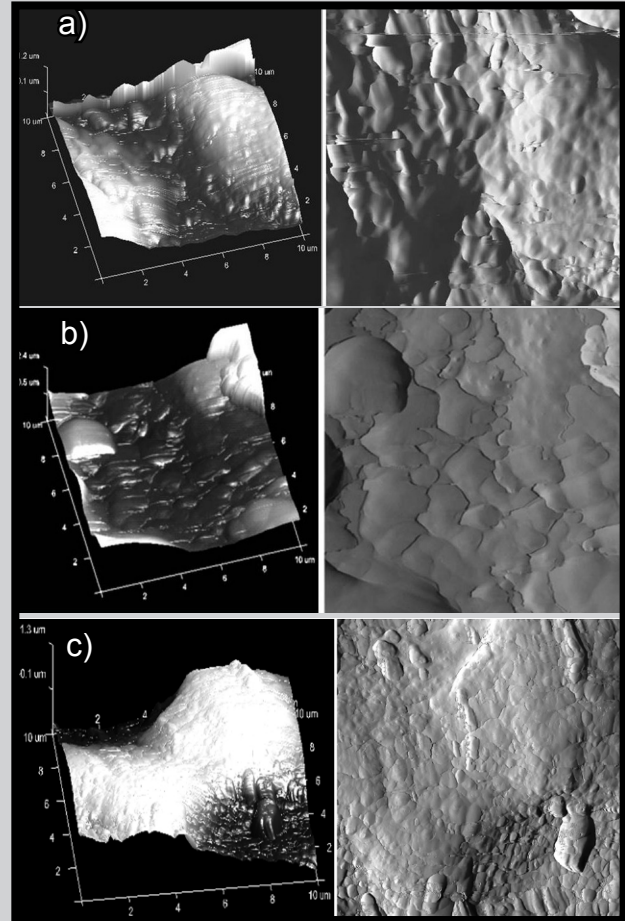
Based on surface observation, it was found that the type of surface activation prior to the oxidation process has a significant impact on the structure and topography of the coatings. For each oxidation time there is a difference in surface topography. After oxidation for 6 h, the Ti oxide layer after grinding has lower roughness parameters than the Ti layer surface after sandblasting, but the surface topography (FIG. 4) shows local irregularities and differences in the roughness of the oxide layer. However, observing both the ground and sandblasted samples after oxidation in a fluidized bed for 8 h, a homogeneous oxide layer is formed (FIG. 4b, 5b) which is shown in the SEM pictures and SEM-EDX analysis (FIG. 6).

Additionally, surface activating visibly influences the formation of a compact TiO_x layer, especially in the sample after sandblasting, with a noticeable growth of the globular areas associated with decrease of the surface energy of the sample after sandblasting and the tendency of the system to reduce the energy in relation to the layer. In this variant of the activation combined with a fluidized bed surface treatment, no porous and flaking areas which are related to the growth of the layer occurs. Scratch tests results shown in the FIG. 7 confirmed also that better adhesion to the substrate and mechanical properties had the TiO_x layers obtained for sandblasted substrate. Critical load for oxide layers obtained on grounded samples was ca. 0.9 N while for the sandblasted substrate was ca. 1.4 N.



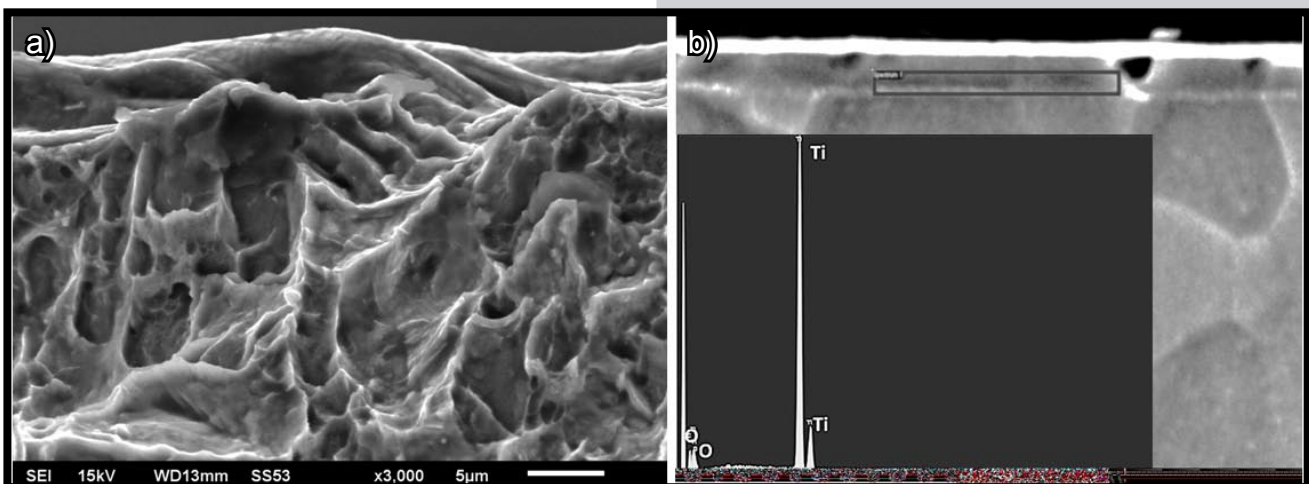
RYS. 4. Topografia powierzchni (2D i 3D) tytanu Grade 2 po szlifowaniu i utlenianiu w złożu fluidalnym w temp. 610°C, obszar skanowania 10 μm x 10 μm : a) czas utleniania 6 h, b) czas utleniania 8 h, c) czas utleniania 12 h.

FIG. 4. Surface topography (2D and 3D) of ground titanium oxidized in a fluidized bed at 610°C, the scanning area 10 μm x 10 μm : a) oxidation time 6 h, b) oxidation time 8 h, c) oxidation time 12 h.



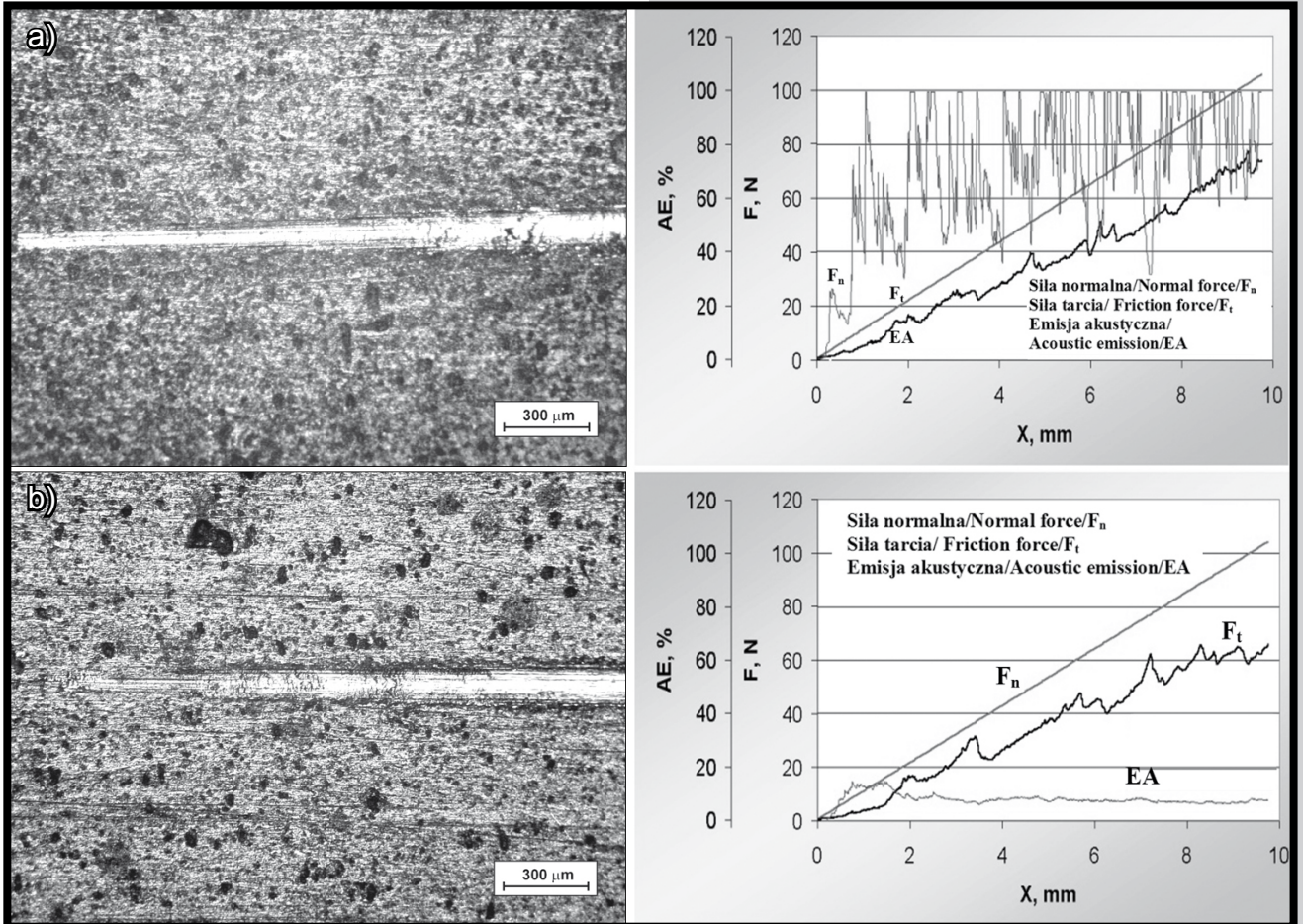
RYS. 5. Topografia powierzchni (2D i 3D) tytanu Grade 2 po piaskowaniu i utlenianiu w złożu fluidalnym w temp. 610°C, obszar skanowania 10 μm x 10 μm : a) czas utleniania 6 godzin, b) czas utleniania 8 godzin, c) czas utleniania 12 godzin.

FIG. 5. Surface topography (2D and 3D) of sandblasted titanium, oxidized in a fluidized bed at 610°C, the scanning area 10 μm x 10 μm : a) oxidation time 6 h, b) oxidation time 8 h, c) oxidation time 12 h.



RYS. 6. Mikrostruktura piaskowanego Ti Grade 2 po utlenianiu w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C i czasie 8 h, a) warstwa TiO_x – SEM, b) warstwa TiO_x – analiza SEM-EDX.

FIG. 6. Microstructure of sandblasted Ti Grade 2 oxidized in a fluidized bed at the temperature of 610°C for 8 hours, a) TiO_x layer – SEM, b) TiO_x layer – SEM-EDX analysis.



RYS. 7. Wyniki badań scratch test Ti Grade 2 po utlenieniu w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C w czasie 8 h: a) powierzchnia szlifowana – obciążenie krytyczne 0,9 N, b) powierzchnia piaskowana – obciążenie krytyczne 1,4 N.
FIG. 7. Scratch test results of Ti Grade 2 oxidized in a fluidized bed at 610°C for 8 hours: a) grounded surface – critical load 0.9 N, b) sandblasted surface – critical load 1.4 N.

Taka budowa powierzchni warstwy wierzchniej tytanu, wskazuje na możliwości doboru parametrów utleniania do konkretnych wymagań stawianych implantom przed wszczęciem. Natomiast zwiększenie czasu utleniania tytanu w złożu fluidalnym w temperaturze 610°C do 12 godzin po piaskowaniu powoduje powstawanie porów oraz złuszczeń warstwy tlenkowej (RYS. 5 i 7), co znacznie zwiększa podatność na korozję i właściwości mechaniczne uzyskanych powłok tlenkowych (słaba przyczepność), a co za tym idzie jakość powierzchni implantu [9,10].

Podsumowanie

Artykuł prezentuje wyniki umożliwiające dokonanie wyboru wariantu aktywacji mechanicznej i parametrów utleniania tytanu Grade 2 w złożu fluidalnym dla formowania powłok tlenkowych o zróżnicowanej energii powierzchniowej spełniających wymogi stawiane materiałom stosowanym w biomedycynie. Autorzy wskazują również na potrzebę stosowania procesu aktywacji mechanicznej powierzchni przed utlenianiem, w celu jej poprawy oraz zapewnienia odpowiednich właściwości użytkowych implantów.

Podziękowania

Praca naukowa sfinansowana z środków budżetowych na naukę w latach 2010-2013 jako projekt badawczy N N507 231240 i N N507 472837.

Such a structure of titanium surface layer makes it possible for the implant manufacturer to select oxidation parameters for specific implant requirements prior to implantation. However, increasing the time of titanium oxidation in a fluidized bed at 610°C to 12 hours after sandblasting leads to generating pores (FIG. 5 and 7) which significantly reduce the corrosion resistance and mechanical properties of the oxide coatings (poor adhesion) and therefore worsens implant surface quality [9,10].

Conclusions

The article presents the results that make it possible to select one of the mechanical activation variants and parameters of Grade 2 titanium oxidation in a fluidized bed for the formation of homogenous oxide coatings which meet the requirements for materials used in biomedicine. The authors also point to the need for a mechanical activation process of the surface before oxidation, in order to change its topography, improve oxide layer adhesion and mechanical properties and finally to ensure adequate exploitation properties of implants.

Acknowledgements

Scientific research financed from the budget for science in the years 2010-2013 as a research project N N507 231240 and N N507 472837.

Piśmiennictwo

- [1] Paduch D.A., Niedzielski J.: Materiały biomedyczne. Część I: Pojęcie filmu biologicznego (biofilmu) i fizykochemiczne podstawy przyczepności substancji organicznych do biomateriałów. *Chirurgia Polska* 7, 3 (2005) 180-191.
- [2] Cacciafesta P., Hallam K.R., Watkinson A.C., Allen G.C., Miles M.J., Jandt K.D.: Visualisation of human plasma fibrinogen absorbed on titanium implant surfaces with different roughness. *Surf. Sci* 491 (2001) 405-420.
- [3] Anselme K., Linez P., Bigerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Iost A., Leroy J.M.: The relative influence of the topography and chemistry TiAl64V surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 21 (2000) 1567-157.
- [4] Lopez M.F., Gutierrez A., Jimenez J.A.: In vitro corrosion behavior of Ti alloys without V for biomedical applications. *Electrochim. Acta* 47 (2002) 1359-1364.
- [5] Zappa-Gałkowska J., Cieślik T.: Od obsydianu do tytanu, czyli historia wszczepów śródkostnych – na podstawie piśmiennictwa. *Czas. Stomatolog.* 61 (2008) 366-372.

References

- [6] Davies J.E.: Mechanisms of endosseous integration, *Int. J. Prosthodont* 11, 5 (1998) 391-401.
- [7] Bathomarco R.V., Solorzano G., Elias C.N., Prioli R.: Atomic force microscopy analysis of different surface treatment of Ti dental implant surfaces. *Applied Surface Science* 233 (2004) 29-34.
- [8] Chauvy P.F., Madore C., Landolt D.: Variable length scale analysis of surface topography: characterization of titanium surfaces for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology* 110 (1998) 48-56.
- [9] Jasiński J., Podsiad P., Szymańska S., Jeziorski L.: Warstwa wierzchnia tytanu GRADE 2 po utlenianiu w złożu fluidalnym. *Inżynieria Powierzchni* 2 (2011) 49-52.
- [10] Jasiński J., Podsiad P., Szymańska S., Lubas M.: Właściwości tytanu po utlenianiu w złożu fluidalnym. *Inżynieria Materiałowa* 4, 182 (2011) 446-449.



.....

STUDIA PODYPLOMOWE

Biomateriały – Materiały dla Medycyny

2013/2014

<p>Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów</p> <p>Kierownik: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH</p>	<p>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</p> <p>http://www.agh.edu.pl/pl/studia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny.html</p>
<p>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.</p>	
<p>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 biodegradacji materiałów.</p>	
<p>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)</p>	
<p>Czas trwania: 2 semestry (od XI 2013 r. do VI 2014 r.)</p>	<p>Opłaty: 2 600 zł</p>
<p>Informacje dodatkowe: Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.</p>	

.....