

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 121

Numer 121

Volume XVI

Rok XVI

OCTOBER 2013

PAŹDZIERNIK 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

Górnico-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

Issue: 250 copies

Nakład: 250 egz.

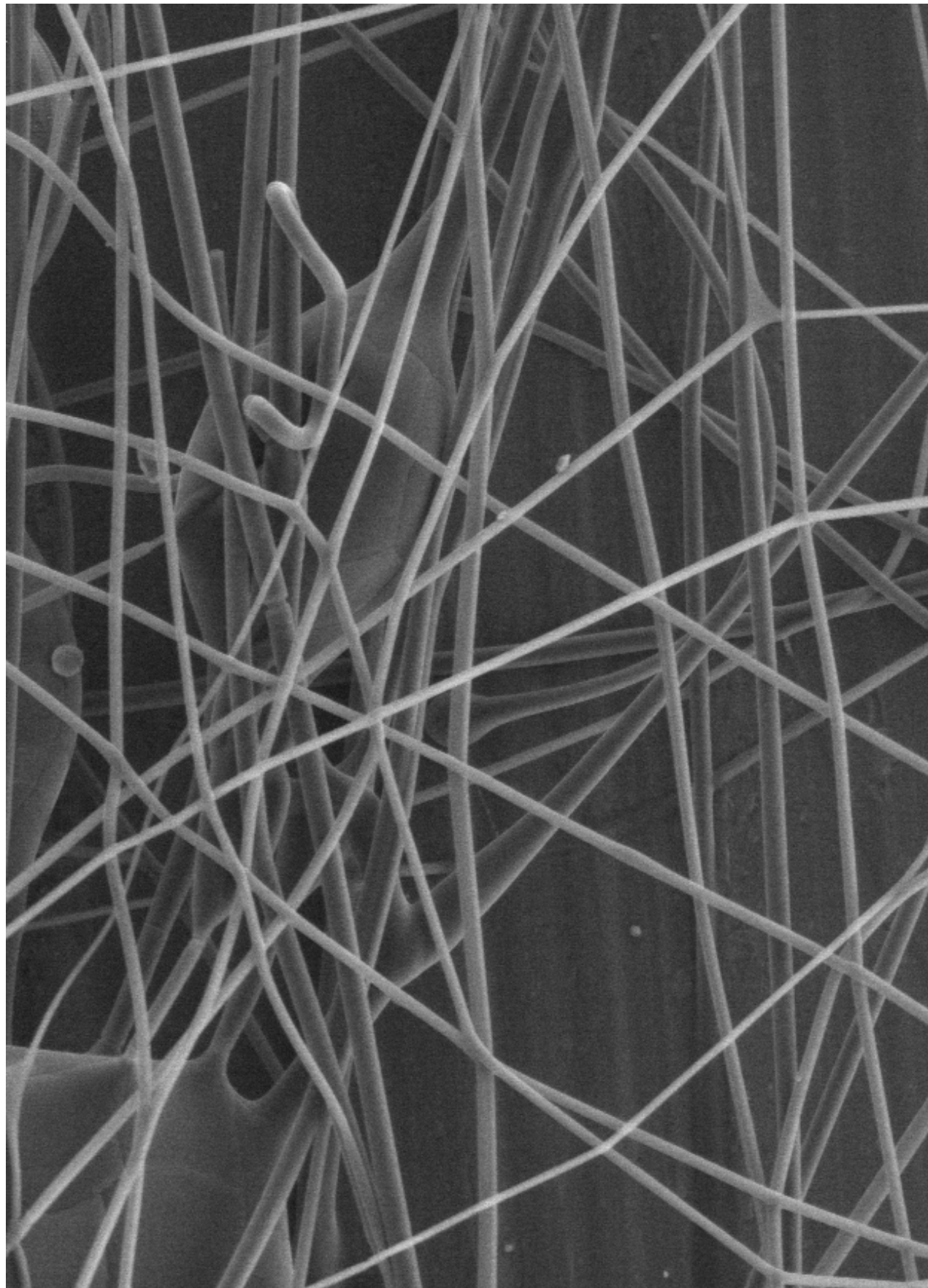
Scientific Publishing

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

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

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 Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. 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

*24th Conference on
BIOMATERIALS
IN MEDICINE
AND
VETERINARY
MEDICINE*

*9-12 October 2014
Hotel "Perła Południa"
Rytro, Poland*

www.biomat.agh.edu.pl



SPIS TREŚCI

NEEDLE-PUNCHED FIBROUS POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING IZABELLA RAJZER, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS, JANUSZ FABIA, EWA SARNA	2
BADANIA MIKROSKOPOWE NANOWŁÓKNISTYCH STRUKTUR Z POLILAKTYDU I ŻELATYNY JAKO POTENCJALNYCH BIOMATERIAŁÓW DLA MEDYCYNY REGENERACYJNEJ ANNA MAGIERA, STANISŁAW BŁAŻEWICZ	6
OCENA ODLEWÓW STOPU NIKLU W KONTEKŚCIE ICH PRZYDATNOŚCI PO ZASTOSOWANIU PROTETYCZNEGO ZŁOMU POPRODUKCYJNEGO KAROLINA BEER-LECH, KRZYSZTOF PAŁKA, JANUSZ BOROWICZ	13
CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA PORCELAN NISKOTOPLIWYCH STOSOWANYCH W TYTANOWYCH POŁĄCZENIACH DLA STOMATOLOGII MAŁGORZATA LUBAS, MONIKA GŁĘBICKA, ZBIGNIEW BALAGA, CEZARY KOLAN, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI	19
MATERIAŁY POLIMEROWE I WĘGLOWE W ASPEKCIE ZASTOSOWANIA JAKO MATERIAŁ KONSTRUKCYJNY DYSKU POLSKIEJ MECHANICZNEJ ZASTAWKI SERCA - OCENA WYBRANYCH WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH AGNIESZKA SZUBER, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK, KAROLINA JANICZAK, MACIEJ GŁOWACKI, MACIEJ GAWLIKOWSKI, ROMAN KUSTOSZ, MAŁGORZATA GONSIOR, PIOTR WILCZEK, STANISŁAW DUBER, WITOLD KACZOROWSKI, PIOTR NIEDZIELSKI, JACEK GRABARCZYK, WITOLD WALKE	25
POROWATE KOMPOZYTY POLIURETAN/ β -TCP DO ZASTOSOWAŃ ORTOPEDYCZNYCH PIOTR SZCZEPAŃCZYK, KRZYSZTOF PIETRZYGA, KINGA PIELICHOWSKA, JAN CHŁOPEK	33
SYNTEZA ENZYMATYCZNA MULTIBLOKOWEGO KOPOLIMERU POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU-CO-GLIKOLU ETYLENOWEGO) (PBS-EG) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZEPU CANDIDA ANTARCTICA BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY	42

CONTENTS

NEEDLE-PUNCHED FIBROUS POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING IZABELLA RAJZER, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS, JANUSZ FABIA, EWA SARNA	2
MICROSCOPIC STUDY OF NANOFIBROUS STRUCTURES OF POLYLACTIDE AND GELATINE AS POTENTIAL BIOMATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE ANNA MAGIERA, STANISŁAW BŁAŻEWICZ	6
EVALUATION OF NICKEL ALLOY CASTINGS IN THE CONTEXT OF THEIR RELEVANCE TO THE USE OF POST-PRODUCTION SCRAP APPLICATION KAROLINA BEER-LECH, KRZYSZTOF PAŁKA, JANUSZ BOROWICZ	13
COMPARISON BETWEEN LOW-MELTING PORCELAIN USED IN TITANIUM FRAMEWORKS IN DENTISTRY MAŁGORZATA LUBAS, MONIKA GŁĘBICKA, ZBIGNIEW BALAGA, CEZARY KOLAN, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI	19
POLYMERIC AND CARBON MATERIALS APPLIED IN THE CONSTRUCTION OF POLISH MECHANICAL VALVE DISK - EVALUATION OF SELECTED PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES AGNIESZKA SZUBER, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK, KAROLINA JANICZAK, MACIEJ GŁOWACKI, MACIEJ GAWLIKOWSKI, ROMAN KUSTOSZ, MAŁGORZATA GONSIOR, PIOTR WILCZEK, STANISŁAW DUBER, WITOLD KACZOROWSKI, PIOTR NIEDZIELSKI, JACEK GRABARCZYK, WITOLD WALKE	25
POROUS COMPOSITES POLYURETHANE/ β -TCP FOR ORTHOPAEDIC APPLICATIONS PIOTR SZCZEPAŃCZYK, KRZYSZTOF PIETRZYGA, KINGA PIELICHOWSKA, JAN CHŁOPEK	33
ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(BUTYLENE SUCCINATE-CO-ETHYLENE GLYCOL) MULTIBLOCK COPOLYMER (PBS-EG) CATALYZED BY LIPASE B FROM CANDIDA ANTARCTICA BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY	42

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

NEEDLE-PUNCHED FIBROUS POLYCAPROLACTONE SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING

IZABELLA RAJZER^{1*}, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS²,
JANUSZ FABIA², EWA SARNA²

ATH, UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,
2 WILLOWA STR., 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND:

¹ DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS,
DIVISION OF MATERIALS ENGINEERING,

² FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE

* E-MAIL: IRAJZER@ATH.BIELSKO.PL

Abstract

In the present work a three dimensional composite scaffolds for bone tissue engineering were created by a carding and needle-punch processes. Highly porous nonwoven fabrics were obtained from PCL and PCL/n-HAp cut fibers without the use of any chemicals during the manufacturing process. The properties of nonwoven scaffolds were examined by SEM, FTIR, DSC and TGA methods. The average pore diameter as well as the pore size distribution of nonwoven fabrics were measured by a capillary flow porometry. The obtained results suggest that needle-punching method can be used to produce highly porous microstructures with an interconnected pore network.

Keywords: needle-punched nonwovens, scaffold, hydroxyapatite, poly(ϵ -caprolactone)

[*Engineering of Biomaterials 121 (2013) 2-5*]

Introduction

The design of the scaffold plays a significant role for bone tissue engineering, since the matrix provides the cells with a tissue-specific environment and architecture [1]. Ideal scaffold for bone tissue engineering should possess the following characteristics: (1) highly porous microstructure with an interconnected pore network; (2) be biodegradable with a controllable degradation time; (3) have suitable surface chemistry; (4) adequate mechanical properties that match those of the tissue at the site of implantation, and (5) be easily processed to form a variety of shapes and sizes [2]. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a semi-crystalline biodegradable polyester. It is well known that degradation of semicrystalline polymers occurs in two stages. The first stage consists of degradation of the amorphous phase, resulting in an increase in crystallinity of polymer. The second stage starts when majority of the amorphous regions are degraded; subsequently the crystalline phase is degraded [3]. The advantages of fibre based scaffold over other kinds of structures is that they present remarkably increased surface area for cell attachment and a significantly improved interconnected pore architecture that provides easier pathways for diffusion of gases, transportation of nutrients and migration of cells [4]. Using electrospinning it is possible to achieve the biomimetic nonwoven scaffolds that are composed of a large network of interconnected fibres and pores, resembling the topographic features of the natural extracellular matrix (ECM) [5]. However electrospun scaffolds retain several problems such as low stiffness and mechanical stability as well as lack of control of pore diameter and distribution [6].

Needle-punched nonwoven fabrics made of resorbable fibres can meet all criteria which are considered necessary for designing the ideal scaffold structure. The type of needle, number of punches per measured area, number of layers and amount of fibre entanglement within the layers can be designed to create a structure with the necessary properties to facilitate growth of tissue [7]. Moreover it is possible to modify the surface of needle-punched nonwoven fabrics with an electrospinning method. Hydroxyapatite (HAp) is a calcium phosphate-based bioceramics which is frequently used as a bone graft substitute. HAp is bioactive, osteoconductive, non-toxic, nonimmunogenic and its structure is crystallographically similar to that of bone apatite [8]. Our earlier research indicated that it was possible to incorporate the nanohydroxyapatite (n-HAp) particles into poly(ϵ -caprolactone) matrix during melt spinning process. Presence of HAp particles on the surface of PCL fibres after melt spinning was confirmed by SEM and FTIR studies. The current work was conducted as an extension of previous studies. Our goal was to develop needle-punched nonwoven produced from biodegradable PCL and PCL/n-HAp fibres without the use of chemicals during the manufacturing process. The properties of both nonwoven scaffold after needle punch process were compared and examined.

Materials and Methods

Scaffold production

For this study, polycaprolactone fibres (PCL) containing nanohydroxyapatite (n-HAp), prepared at the Institute of Textile Engineering and Polymer Materials, ATH-University of Bielsko-Biala, were selected. Before the nonwovens were formed, the polymer was extruded by melt-spinning and subsequent stretching to fabricate filaments. Fibres were extruded from the melt with a temperature of 170°C and were spun with a take up velocity of 247 m/min. Nano-hydroxyapatite (5 w/w %) was added to the polymer powder before melting. The receiving of masterbatch of PCL/n-HAp, before the principal process of forming fibres was applied. The other parameters of the forming process were: rotation of the extruder screw 9 rpm and rotation of the passer 10 rpm [9]. Nonwoven scaffolds were prepared from cut PCL and PCL/n-HAp fibres. Initially combed fibres were used to produce a fibrous web by mechanical processing using a laboratory carding machine (FIG. 1a). Then PCL and PCL/n-HAp fibers were bonded together using a needle bed to entangle them (FIG. 1b). For both samples the same amount of needling and needling depth was used. The stitch density (the number of needle penetrations per cm²) was 180.

Methods

A microscopic observation of obtained nonwoven scaffold was made using scanning electron microscopy (Jeol, JSM-5500). Before the observation, the samples were coated with gold using a sputter coater. A PMI capillary flow porometer was applied to measure the pore size distribution of nonwoven fabrics. The FTIR spectra of the nonwoven scaffolds were determined using the Nicolet spectrophotometer (64 scans, in the range of 500 – 3500 cm⁻¹, resolution of 4 cm⁻¹). Mechanical properties of the nonwoven scaffolds were determined on a Zwick-Roell Z 2.5. universal material testing machine at a constant speed of 10 mm/min. The dimensions of samples (width 15 mm, length 100 mm) were measured using digital micrometer and the thickness was measured by Thickness Tester. The samples were tested under tension until failure. DSC (5100 TA Instruments) and TGA (TA Instruments Q 500 TGA) analyses were performed at the following conditions: heating rate - 10°C/min, and nitrogen gas flow - 40 ml/min.

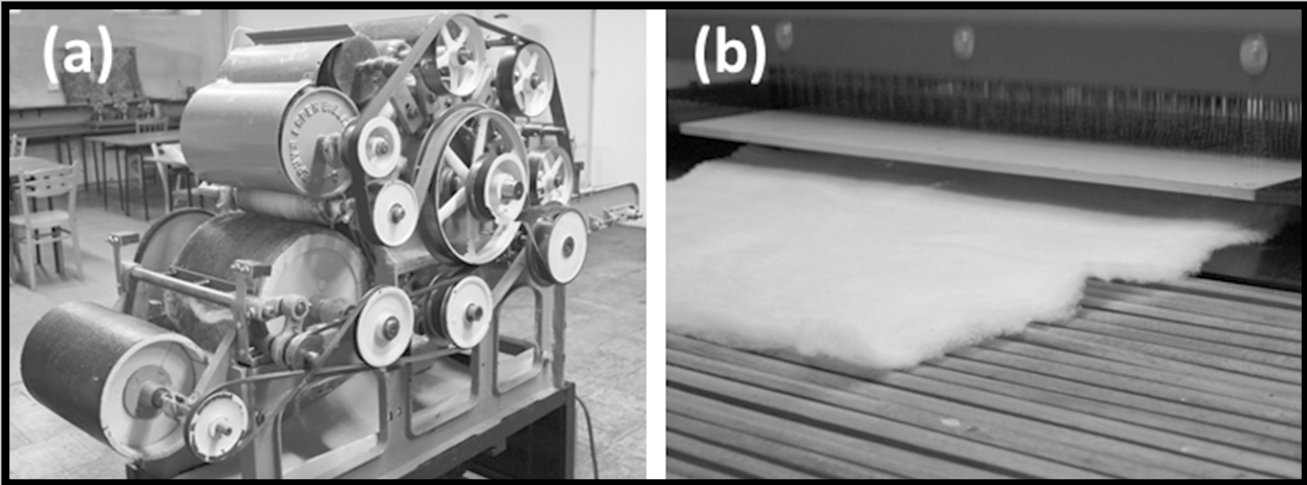


FIG. 1. (a) Laboratory carding machine; (b) Needle-punching nonwoven machine.

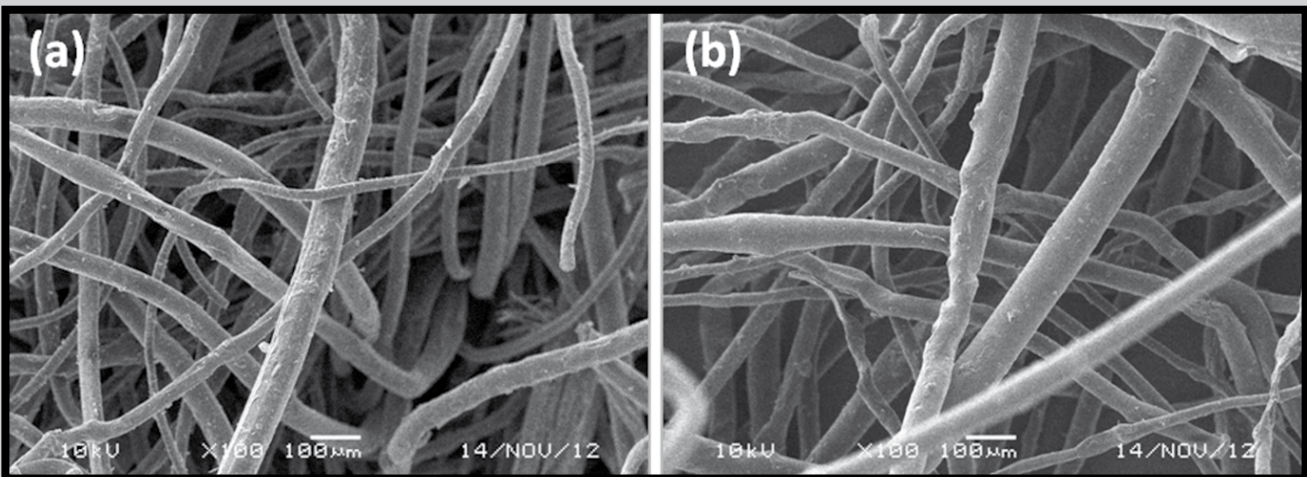


FIG. 2. Microstructure of (a) PCL and (b) PCL/n-HAp nonwovens.

Result and Discussion

The SEM images of the fibrous scaffolds are shown in FIG. 2. The PCL and PCL/n-HAp fibres in the nonwoven scaffold appeared uniformly and randomly distributed without preferential orientation. The microstructure images of nonwoven PCL and PCL/n-HAp demonstrate that they have large surface areas with a high porosity. The results of porosity tests are shown in FIG. 3. The main fraction of pores of unmodified PCL nonwoven fabric is in the range of 160–280 μm . The main fraction of pores of modified PCL/n-HAp nonwoven is centred at 180 μm , however also pores with bigger diameter in the range of 200–400 μm were observed. Fibre diameter distributions before carding process and after carding and needle-punching processes are shown in FIG. 4. The calculated average diameter for polycaprolactone fibre before carding process was $41.8 \mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$, whereas after technological processes the average fibre diameter was slightly smaller $37.6 \mu\text{m} \pm 18 \mu\text{m}$. In the case of composite fibres, the PCL/n-HAp fibre diameter before carding process was $44.4 \mu\text{m} \pm 20 \mu\text{m}$ and after needle-punching process fibre diameter was $49.9 \mu\text{m} \pm 22 \mu\text{m}$. The carding is a process by which fibres are straightened. The fibres diameter distribution presented in FIG. 4 showed that carding process affected the fibres diameter, causing thinning of fibres. The difference in fibre diameter distribution before and after carding process is more pronounced in the case of pure PCL fibres, which are more elastic than modified PCL/n-HAp fibres. FIG. 5 shows FTIR spectra for pure PCL nonwoven fabric and PCL/n-HAp nonwoven fabric.

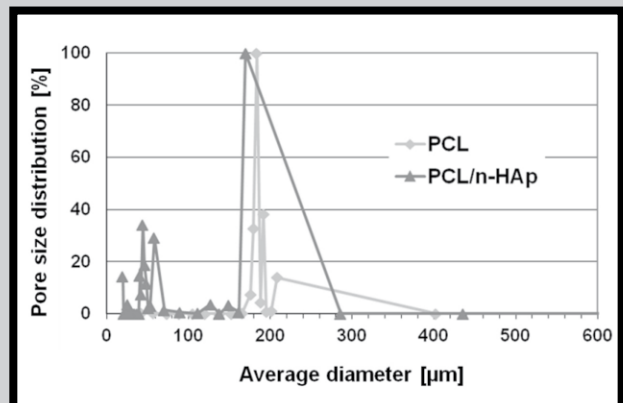


FIG. 3. Pore size distribution of PCL and PCL/n-HAp nonwovens.

The characteristic bands of PCL corresponding to the C=O stretching vibration of the ester carbonyl groups are located at 1727 cm^{-1} . The peaks at $1150\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ are related to the asymmetric stretching vibration of $-\text{COO}-$ and the stretching vibration of $-\text{C}-\text{O}$ bonding at the main polymer chain. In the case of PCL/n-HAp nonwoven the FTIR analysis confirmed that HAp particles remain on the surface of composite fibres after carding and needle-punching processes, which was evidenced by the presence of phosphate groups peaks PO_4^{3-} (associated to HAp) at 568 and 600 cm^{-1} [10].

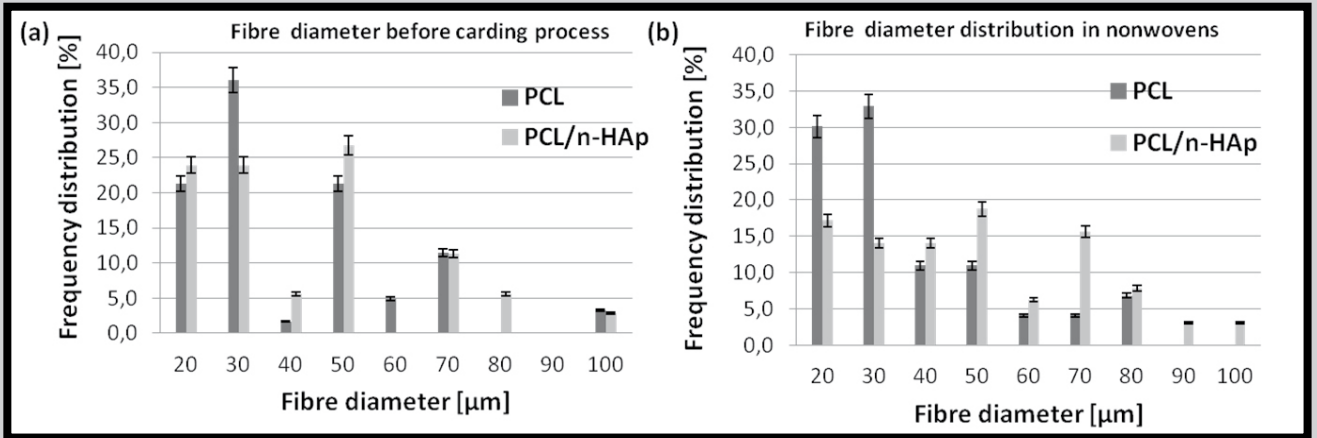


FIG. 4. Fibre diameter distribution: (a) before carding process; (b) after carding and needle-punching process.

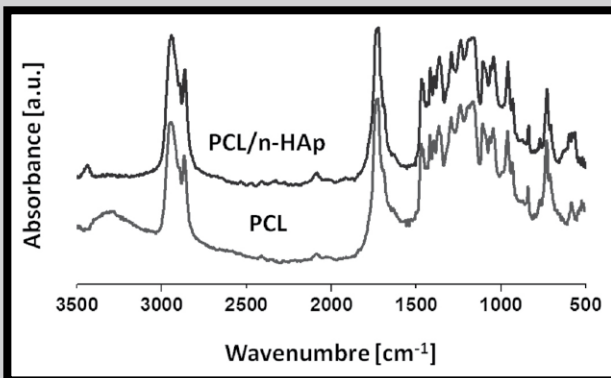


FIG. 5. FTIR spectra of PCL and PCL/n-HAp nonwovens.

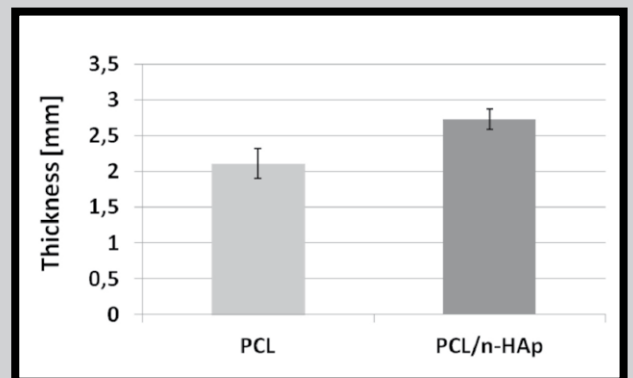


FIG. 6. Thickness of PCL and PCL/n-HAp nonwovens.

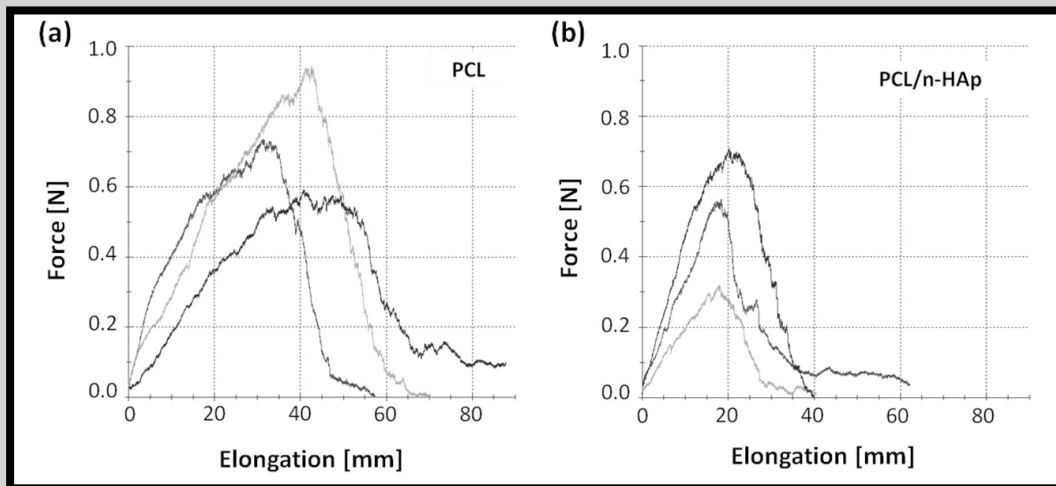


FIG. 7. Force – elongation curves of (a) PCL and (b) PCL/n-HAp nonwovens.

The results of thickness test are shown in FIG. 6 and the typical force-elongation curves for both nonwoven fabric are presented in FIG. 7. The highest tensile force among the samples of 0.95 N and the largest elongation (about 70 mm) was observed in the case of pure polycaprolactone nonwoven fabric. The higher tensile strength was observed for pure PCL nonwovens (8.75 kPa). In the case of composite PCL/n-HAp fibres tensile strength was 5.04 kPa. FIG. 8 shows the TGA analyses of PCL and PCL/n-HAp nonwovens. TGA curve of PCL nonwoven showed a two-step degradation process (FIG. 8a) whereas for PCL/n-HAp nonwoven three stages of degradation were observed (FIG. 8b)

probably related to the loss of physically adsorbed water and gradual dehydroxylation of HAp powder. The degradation (or decomposition) of PCL starts at approximately 300°C. Temperatures of a maximum rate of weight loss proceeding during thermal degradation of PCL/n-HAp nonwovens (curve dTG on FIG. 7a-b) were higher than those of pure PCL nonwovens. For both samples, the melting temperature was 59°C, and the DSC curve shows one endothermic peak of melting (FIG. 9), which means that the incorporation of hydroxyapatite nanoparticles into PCL fibres had no influence on the mean size of PCL crystallites.

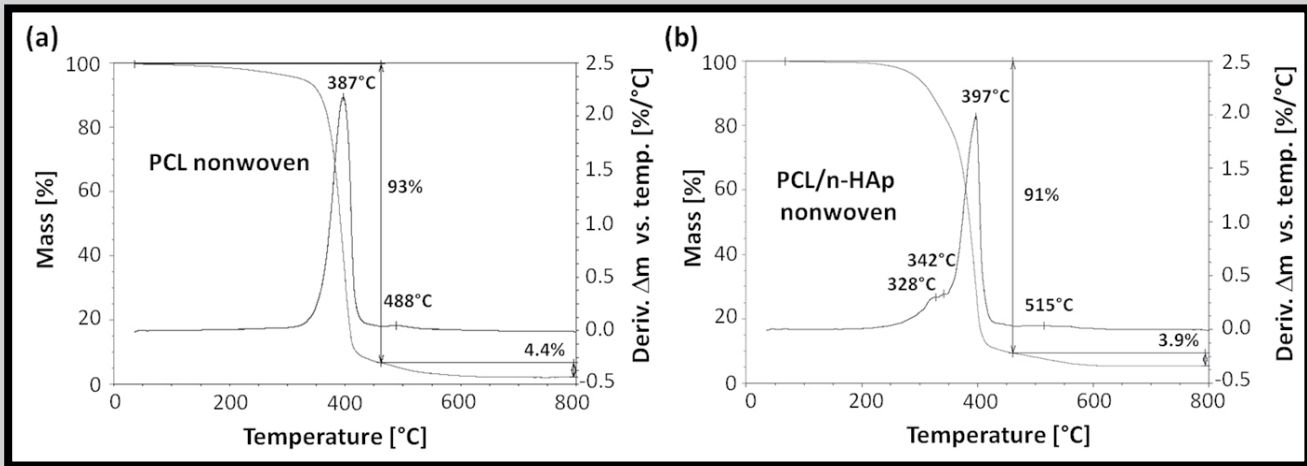


FIG. 8. TGA curves of (a) PCL and (b) PCL/n-HAp nonwovens.

Conclusion

Tissue scaffold is a 3D structure that provides a site for cell attachment, proliferation and differentiation; therefore it must possess desired porosity with an interconnected pore network and be easily processed to form a variety of shapes and sizes. Needle punching is the oldest and best established method of forming nonwoven textile materials. The aim of the presented work was to develop needle-punched nonwovens produced from PCL and PCL/n-HAp fibres without the use of chemicals during the manufacturing process. The obtained results suggest that needle-punching method can be used to produce highly porous polycaprolactone-hydroxyapatite nonwoven scaffolds. Moreover microstructure of nonwoven scaffold obtained by needle-punch process can be easily adjusted according to application. Our future work will focus on production of hybrid scaffold made of nonwoven micro-fabrics (in order to provide sufficient mechanical parameters as well as 3D structure) and of electrospun nanofibers (to ensure proper adhesion, proliferation and growth of cells and tissue).

Acknowledgments

This work was supported by the Minister of Science and Higher Education; project number N N507 550938.

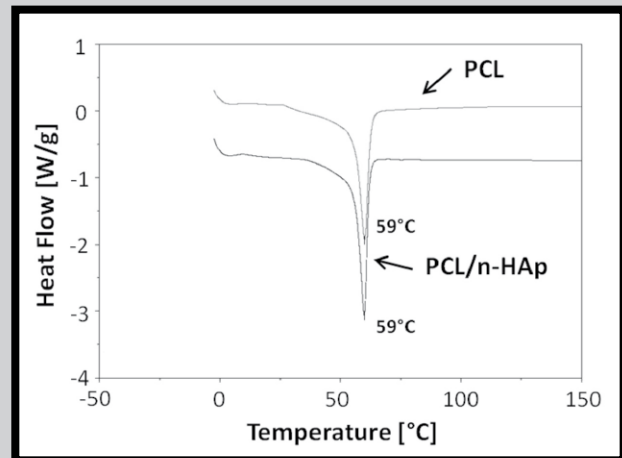


FIG. 9. DSC curves of PCL and PCL/n-HAp nonwovens.

References

- [1] Chung S., Ingle N.P., Montero G.A., Kim S.H., King M.W.: Bioresorbable elastomeric vascular tissue engineering scaffolds via melt spinning and electrospinning. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 1958-1967.
- [2] Malheiro V.N., Caridade S.G., Alves N.M., Mano J.F.: New poly(ϵ -caprolactone)/Chitosan blend fibers for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 418-428.
- [3] Rutkowska M., Krasowska K., Heimowska A., Steinka L., Janik H., Haponiuk J., Karlsson S.: Biodegradation of Modified Poly(ϵ -caprolactone) in Different Environments. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 11, No. 4 (2002) 413-420.
- [4] Manjubala I., Woesz A., Pilz C., Rumpel M., Fratzi-Zelman N., Roscher P., Stampf J., Fratzi P.: Biomimetic mineral-organic composite scaffolds with controlled internal architecture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16 (2005) 1111-1119.
- [5] Zhang K., Yin A., Huang C., Wang C., Mo X., Al-Deyh S.S., El-Newehy M.: Degradation of electrospun SF/P(LLA-CL) blended nanofibrous scaffolds in vitro. *Polymer Degradation and Stability* 96 (2011) 2266-2275.
- [6] Santos M.I., Tuzlakoglu K., Fuchs S., Gomes M.E., Peters K., Unger R.E., Piskin E., Reis R.L., Kirkpatrick C.J.: Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials* 29 (2008) 4306-4313.
- [7] Rajzer I., Grzybowska-Pietras J., Janicki J.: Fabrication of bioactive carbon nonwovens for bone tissue regeneration. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe* 19 (84) (2011) 66-72.
- [8] Shi Z., Huang X., Cai Y., Tangand R., Yang D.: Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 338-345.
- [9] Rajzer I., Fabia J., Graczyk T., Piekarczyk W.: Evaluation of PCL and PCL/n-HAp fibres processed by melt spinning. *Engineering of Biomaterials* 118 (2013) 2-4.
- [10] Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Paluszkiwicz C.: FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure* 744-747 (2005) 657-661.

BADANIA MIKROSKOPOWE NANOWŁÓKNISTYCH STRUKTUR Z POLILAKTYDU I ŻELATYNY JAKO POTENCJALNYCH BIOMATERIAŁÓW DLA MEDYCINY REGENERACYJNEJ

ANNA MAGIERA*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ

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

Streszczenie

W wyniku procesu elektroformowania (ang. *electrospinning, ES*) otrzymywana jest włóknista forma polimeru. W wyniku modyfikacji polimerowego prekursora poprzez dodatek nanomodifikatorów możliwe staje się uzyskanie włókien nanokompozytowych. Jednoczesne elektroformowanie (ang. *concurrent electrospinning, co-ES*), stanowiące modyfikację standardowej techniki ES, umożliwia wytworzenie nowej grupy materiałów, np. powłok zbudowanych z różnorodnych komponentów, włóknistych struktur przestrzennych na rusztowania komórkowe, materiałów gradientowych o różnym udziale składnika włóknistego, włóknistych zbrojeń w technologii nanokompozytów i wielu innych.

Celem niniejszej pracy było opracowanie warunków formowania nanowłókien z PLA i GEL. Badania te stanowią pierwszy etap pracy, której celem jest opracowanie warunków jednoczesnego elektroformowania kompozytowej struktury PLA/GEL. W ramach omawianej pracy otrzymano oddzielnie włókna polimerowe z PLA lub żelatyny. W tym celu przeprowadzono proces elektroformowania z wykorzystaniem układu doświadczalnego zaprojektowanego i skonstruowanego w Katedrze Biomateriałów, AGH. Włókniste osady w formie maty były zbierane na uziemionym, obracającym się kolektorze pokrytym folią aluminiową. Otrzymane materiały były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (ang. *scanning electron microscope, SEM*). Podczas badania uzyskanych włókien polimerowych wyznaczono ich średnice oraz analizowano ich morfologię. Średnice uzyskanych włókien z PLA zawierają się w przedziale 0,8-2,0 μm , natomiast włókien żelatynowych w przedziale 0,3-0,6 μm . Uzyskane wartości charakteryzowały się niewielkim różnicowaniem i zależały od warunków eksperymentalnych procesu elektroformowania.

Przedstawiono także wyniki badań otrzymywania włóknistej warstwowej kompozycji złożonej z nanowłókien. Podczas tego procesu na włókna polilaktydowe zebrane na folii aluminiowej nałożono warstwę włókien żelatynowych. Uzyskane struktury były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.

Słowa kluczowe: elektroformowanie, inżynieria tkankowa, nanowłókna, PLA, żelatyna

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 6-12]

MICROSCOPIC STUDY OF NANOFIBROUS STRUCTURES OF POLYLACTIDE AND GELATINE AS POTENTIAL BIOMATERIALS FOR REGENERATIVE MEDICINE

ANNA MAGIERA*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ

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

Abstract

During the electrospinning (ES) process fibrous form of the polymer is obtained. Due to specific modification of a polymer precursor with nanoconstituents, nanocomposite fibres can also be produced. The concurrent electrospinning (co-ES) technique is a modification of the standard ES method in which multiple polymeric jets are being generated. This technique enables to develop new forms of structures – e.g., coatings, 3-D space architectures, gradient materials, fibrous reinforcements in nanocomposites.

Our aim was to obtain the PLA and GEL nanofibres as the first stage of the experiments leading to concurrent electrospinning of the composite polylactide/gelatine material. In this work individual polymeric fibres made of PLA or GEL were successfully produced. To do so the electrospinning setup designed and constructed in our Department was used. Fibrous deposits were collected on grounded rotating mandrel covered with aluminium foil. The obtained materials were analysed using scanning electron microscope (SEM). During the examination of the fibres acquired their diameters were measured. The general analysis of their morphologies was performed as well. Diameters of the PLA fibres obtained in this work ranged between 0.8 and 2.0 μm . GEL fibres were much smaller and had diameters ranging from 0.3 to 0.6 μm . All these values were narrowly distributed and depended on the experimental conditions.

Composite polymeric material, get by layered deposition technique, was also obtained. During this process PLA fibres were firstly obtained on the aluminium foil and then covered with GEL fibres. The structure obtained was analysed in the same way as individual, nanocomposite polymeric fibres.

Keywords: electrospinning, tissue engineering, nanofibres, PLA, gelatine

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 6-12]

Wprowadzenie

Podczas procesu elektroformowania (ang. electrospinning, ES) otrzymywana jest włóknista forma polimeru z jego stopu lub roztworu [1]. Typowy układ doświadczalny składa się ze źródła polimeru (zazwyczaj jest nim strzykawka wypełniona roztworem polimeru i zakończona igłą), wysokonapięciowego zasilacza i kolektora. Kształt tego ostatniego elementu może być różny, np. poziomo zorientowana tarcza, obracający się bęben, ramka czy ostro zakończony i ustawiony pionowo dysk. Liczne, udokumentowane do tej pory przykłady zastosowania materiałów włóknistych, uzyskanych w wyniku elektroformowania, włączając chemię analityczną, ochronę środowiska, elektrochemię, przemysł, medycynę i produkcję przedmiotów codziennego użytku [2-8], czyni tę metodę niezwykle wszechstronną i użyteczną.

Ponieważ polilaktyd (PLA) jest biogodnym i biodegradowalnym polimerem stosowanym od lat w medycynie, stanowi on bardzo dobry materiał na rusztowania komórkowe w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej [9]. Wielu autorów zwracało uwagę na fakt, że struktury wykonane z PLA wspomagają tworzenie i regenerację tkanek [10-12].

Włókniste formy materiałowe wytworzone metodą elektroformowania przypominają swoją budową macierz pozakomórkową, a dzięki możliwości ich wytwarzania w szerokim zakresie średnic włókien (od dziesiątków nanometrów do kilku mikrometrów [1]) stanowią potencjalnie obiecujące biomateriały na rusztowania komórkowe do regeneracji tkanki kostnej, chrzęstnej, połączeń szkieletowych pomiędzy nimi, czy tkanki nerwowej [13-16]. Z tych względów, przestrzenne struktury zbudowane z nanowłókien polilaktydowych formowanych metodą elektroformowania, mogą być zastosowane również do regeneracji niewielkich ubytków tkanki kostnej. Co więcej, kompozytowy układ włókien z PLA i żelatyny zwiększa biogodność samego polilaktynu i ułatwia jego wchłanianie w żywym organizmie [17]. W porównaniu do powszechnie stosowanego w inżynierii tkankowej kolagenu [18,19], żelatyna wykazuje zbliżone właściwości biologiczne, natomiast jej cena jest znacznie niższa [20]. Włóknisty kompozyt PLA/żelatyna stanowi także potencjalny materiał wspomagający regenerację tkanki chrzęstnej. Struktury gradientowe o tym składzie mogą znaleźć zastosowanie jako rusztowania odbudowujące połączenia szkieletowe. W wyniku odpowiedniej modyfikacji prekursora polimerowego niewielkimi ilościami nanododatków, można otrzymać nanokompozytowe materiały włókniste.

Proces równoległego elektroformowania (ang. concurrent electrospinning, co-ES) stanowi modyfikację standardowej techniki ES, w której możliwe jest jednoczesne uzyskanie więcej niż jednej wiązki, z wielu źródeł roztworu polimeru [21-23]. Metoda ta umożliwia tworzenie nowych rodzajów struktur, np. pokryć materiałów zbudowanych z innych materiałów, trójwymiarowych struktur przestrzennych (na rusztowania komórkowe dostosowane do konkretnego typu tkanki), materiałów ze zróżnicowanym udziałem (gradientem) składnika włóknistego, włóknistych wzmocnień w nanokompozytach i wielu innych.

Niniejsza praca stanowi pierwszy etap badań dotyczących otrzymywania indywidualnych nanowłókien z poli(kwasu mlekowego) (PLA) i żelatyny, a w dalszej fazie, badania będą miały na celu wytworzenia kompozytowego układu polilaktyd/żelatyna, w wyniku jednoczesnego elektroformowania z dwóch różnych roztworów polimeru. Otrzymane w pracy materiały włókniste były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.

Introduction

During the electrospinning (ES) process fibrous structure of the polymer is obtained from its melt or solution [1]. A typical experimental setup consists of polymer source (usually a syringe ended with a needle), high voltage supply and collector. The shape of the latter may vary including flat horizontal disc, rotating mandrel, frame or edged perpendicular disk. Numerous already documented applications of fibrous structures obtained via electrospinning including analytical chemistry, environmental protection, electrochemistry, industry, medicine or everyday life products [2-8], make this technique both versatile and exceptionally interesting.

Since polylactide (PLA) is biocompatible and biodegradable material used in medicine for years, it constitutes a very good material for scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine [9]. Numerous authors have already proven the beneficial role of PLA structures in enhancing tissue formation and regeneration [10-12].

The microstructure of fibrous forms of a material obtained via ES technique is similar to the extracellular matrix, and due to the possibility of preparing a wide range of fibres' diameters (from tens of nm to several microns [1]), the structures obtained by this technique provide promising biomaterials for tissue engineering scaffolds, especially in order to regenerate bone and cartilage tissues, skeletal joints between them or neural tissue [13-16]. For these reasons the PLA-based electrospun fibrous structures may also be considered as scaffolds to regenerate small size bone defects. Moreover, polylactide and gelatine fibres-based hybrid structure has already been proven to enhance PLA compatibility and facilitates its degradation [17]. When compared to collagen, commonly used material in tissue engineering [18,19], gelatine manifests similar properties, whereas its price is much lower [20]. PLA/gelatine fibrous compositions may be considered for application in guided cartilage regeneration as well. Gradient structures of such composition can be applied in skeletal junctions scaffolds. Due to specific modification of a polymer precursor with nanoconstituents, nanocomposite fibres can also be produced.

The concurrent electrospinning (co-ES) technique is a modification of the standard ES method in which more than one jet can simultaneously be generated from multiple polymer sources [21-23]. This technique enables to develop new material forms, e.g. coatings consisting of various components, 3-D space architectures (for scaffolds matched to the type of tissues), gradient materials differing in amount of fibrous component, fibrous reinforcements for nanocomposite technology, etc.

This work focuses on the obtaining of the individual poly(lactic acid) (PLA) and gelatine nanofibres as the first stage of the experiments aiming at development of concurrent electrospinning of the composite polylactide/gelatine material. The structures manufactured were analysed using scanning electron microscopy (SEM).

Materials and Methods

In order to obtain polymeric nanofibers by ES the PLA (Ingeo™ Biopolymer 3251D) and gelatine (GEL) (POCH, analytical grade) were used. As solvents dichloromethane (DCM) (POCH, analytical grade), N,N-dimethylformamide (DMF) (POCH, analytical grade) and concentrated (99.5-99.9%) acetic acid (CH₃COOH) (POCH, analytical grade) were used. The PLA solution with a concentration of 15% (wt/v) was prepared in mixed solvents DCM, DMF 3:1 (wt:wt) [24]. A series of GEL solutions (concentrations 10, 15, 20 and 25% (wt/v)) with concentrated acetic acid was prepared according to the procedure describing in literature [17].

Materiały i metody

Do otrzymania nanowłókien polimerowych z wykorzystaniem techniki elektroformowania zastosowano polilaktyd (PLA) (Ingeo™ Biopolymer 3251D) i żelatynę (GEL) (POCH, CZDA). Jako rozpuszczalników użyto dichlorometanu (DCM) (POCH, CZDA), N,N-dimetyloformamidu (DMF) (POCH, CZDA) oraz stężonego (99,5-99,9%) kwasu octowego (CH_3COOH) (POCH, CZDA). Roztwór PLA o stężeniu 15% (wag./obj.) został sporządzony w mieszaninie DCM, DMF 3:1 (stos. wag.) [24]. Serię roztworów żelatyny (stężenia 10, 15, 20 i 25% (wag./obj.)) przygotowano w stężonym kwasie octowym według procedury opisanej w pracy [17].

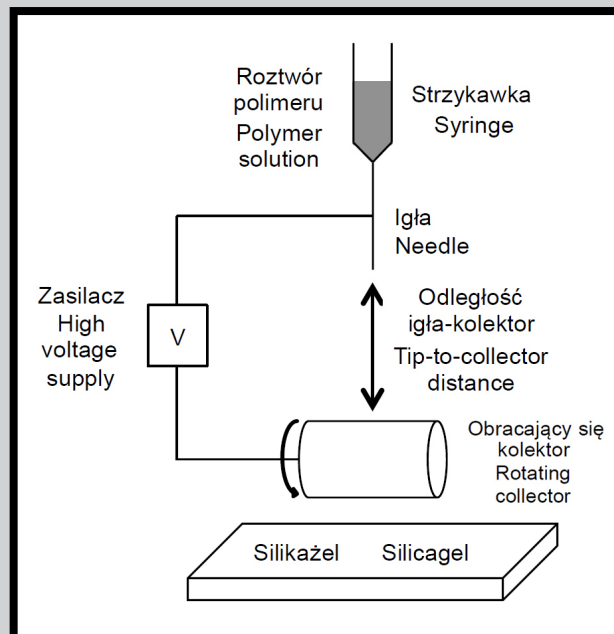
Proces elektroformowania prowadzono na urządzeniu zaprojektowanym i skonstruowanym w Katedrze Biomateriałów, AGH (RYS. 1). Strzykawkę o pojemności 10 ml zakończoną igłą wypełniano roztworem polimeru. Pomiedzy igłą a kolektor (obracający się bęben) przykładano napięcie 12 kV. Odległość pomiędzy igłą a kolektorem wynosiła 3 cm. Opisane warunki prowadzenia procesu elektroformowania zostały określone we wcześniejszych badaniach [24].

Uzyskane materiały były następnie napyłane złotem i badane za pomocą SEM (Nova NanoSEM, FEI z wbudowanym analizatorem EDS). Średnice uzyskanych włókien zostały określone na podstawie analizy zdjęć SEM z wykorzystaniem programu ImageJ 1.48g służącego do przetwarzania obrazu.

Wyniki i dyskusja

Wykorzystując urządzenie przedstawione schematycznie na RYS. 1 otrzymywano oddzielnie nanowłókna PLA i żelatyny. Przykładowe zdjęcia SEM uzyskanych materiałów z PLA przedstawiono na RYS. 2. Otrzymane osady włókniste w formie maty były jednorodne pod względem kształtu, nie stwierdzono występowania żadnych defektów powierzchniowych. Dla wszystkich stosowanych igieł średnice uzyskanych włókien były różne (TABELA 1). Ta niejednorodność może wynikać z niemożności kontrolowania wszystkich parametrów procesu elektroformowania. Z uwagi na brak pompy wymuszającej stały przepływ roztworu polimeru przez igłę, jedynym czynnikiem oddziałującym na układ jest siła grawitacji. Co więcej, ograniczenia konstrukcyjne urządzenia uniemożliwiały prowadzenie procesu przy odległości igły od kolektora większej niż 3 cm. Przykładowy rozkład średnic włókien został przedstawiony na RYS. 3. Na jego podstawie można stwierdzić, że wielkości średnic włókien polilaktydowych wahają się w granicach od 0,8 do 2,0 μm .

Podczas elektroformowania z roztworów żelatyny zastosowano takie same warunki doświadczalne jak w przypadku włókien polilaktydowych. Przeprowadzono serię doświadczeń mających na celu określenie optymalnego stężenia polimeru pozwalającego na otrzymanie włókien żelatynowych. Jak to można zauważyć na podstawie zdjęć SEM uzyskanych struktur (RYS. 4), dla niższych stężeń GEL (10 i 15 %, odpowiednio RYS. 4a i b) włókna powstawały w ograniczonym stopniu, a wzdłuż ich osi występowały liczne zgrubienia. Z drugiej strony, w przypadku stężenia polimeru równego 25% (RYS. 4d), proces elektroformowania praktycznie nie zachodził. W porównaniu do materiałów z PLA, dobrze wykształcone, jednorodne włókna o mniejszych średnicach, uzyskano z 20% (wag./obj.) roztworu żelatyny (RYS. 5). Uśrednione wartości średnic uzyskanych włókien zestawiono w TABELI 1. Przykładowy rozkład wartości średnic dla włókien żelatynowych (RYS. 3) pokazuje, że wartości te zawarte są w przedziale od 0,3 μm do 0,6 μm .



RYS. 1. Schemat obrazujący układ doświadczalny służący do przeprowadzania procesu elektroformowania zaprojektowany i skonstruowany w Katedrze Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

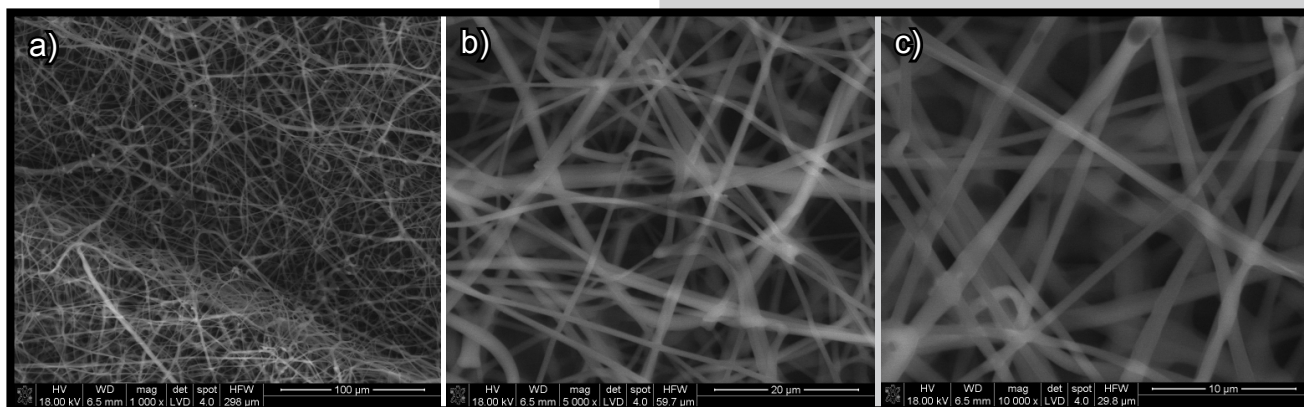
FIG. 1. The scheme depicting the electrospinning setup designed and constructed at the Department of Biomaterials, AGH University of Science and Technology.

The electrospinning process experiments were conducted using a device constructed at the Department of Biomaterials, AGH University of Science and Technology (FIG. 1). A 10 ml syringe, ended with a needle, was loaded with the polymer solution. The voltage of 12 kV was applied between the needle tip and the collector – moving grounded roller covered with an aluminium foil. The tip-to-collector distance was 3 cm. The electrospinning processing conditions were determined in previous experiments [24].

The samples obtained were coated with gold and analysed using scanning electron microscope, SEM (Nova NanoSEM, FEI with EDS analyser). Fibres diameters were calculated via SEM microphotographs analysis using ImageJ 1.48g public domain image processing program.

Results and Discussions

Individual poly(lactic acid) (PLA) and gelatine nanofibres have separately been obtained using the electrospinning experimental setup schematically presented in FIG. 1. Typical SEM micrographs of the obtained PLA fibres are shown in FIG. 2. The fibrous samples were uniform in shape, none surface defects were detected. However, for all the needle diameters used, the diameters of the fibres were different. (TABLE 1). The reason for such a heterogeneity may be the inability of controlling all the experimental conditions of the ES process. Because of the lack of syringe pump, the polymer does not flow constantly during the process but leaks out of the syringe drop by drop due to gravitation force. What is more, structural limitations of the device do not allow to increase the tip-to-collector distance to more than 3 cm. Representative fibre diameters distribution can be seen in FIG. 3. It can be seen that the majority of PLA fibres has diameters ranging from 0.8 to 2.0 μm .



RYS. 2. Zdjęcia SEM włókien z PLA otrzymanych w wyniku elektroformowania z roztworu polimeru o stężeniu 15% (wag./obj.) sporządzonego w DCM, DMF 3:1 (stos. wag.). Skala: a) 100 µm, b) 20 µm, c) 10 µm.

FIG. 2. SEM images of PLA fibres electrospun from the 15% (wt/v) polymer solution in DCM, DMF 3:1 (wt:wt). Scale bars: a) 100 µm, b) 20 µm, c) 10 µm.

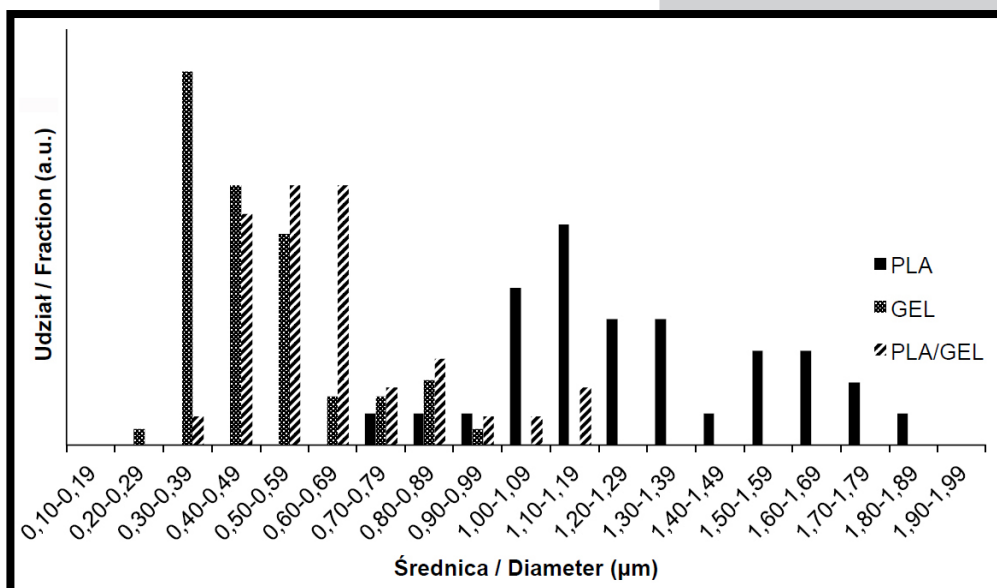
TABLE 1. Średnie wartości średnic włókien wraz z odchyleniami standardowymi wyznaczone dla osadów włóknistych otrzymanych w wyniku procesu elektroformowania.

TABELA 1. Average fibre diameter and standard deviation values calculated for fibrous mats obtained via electrospinning process.

Material	Igła Needle (mm)	Średnia wartość średnicy włókien Average fibre diameter (µm)	Odchylenie standardowe Standard deviation (µm)
PLA	0.6 x 30.0	2.027	0.228
	0.7 x 30.0	0.808	0.067
	0.8 x 40.0	1.193	0.139
	0.9 x 40.0	1.278	0.070
	1.1 x 40.0	1.304	0.085
	1.2 x 40.0	1.558	0.116
GEL	0.6 x 30.0	0.375	0.026
	0.7 x 30.0	0.323	0.014
	0.8 x 40.0	0.464	0.058
	0.9 x 40.0	0.389	0.021
	1.1 x 40.0	0.575	0.072
	1.2 x 40.0	0.420	0.020
PLA/GEL	0.9 x 40.0	0.558 / 1.025	0.029 / 0.150

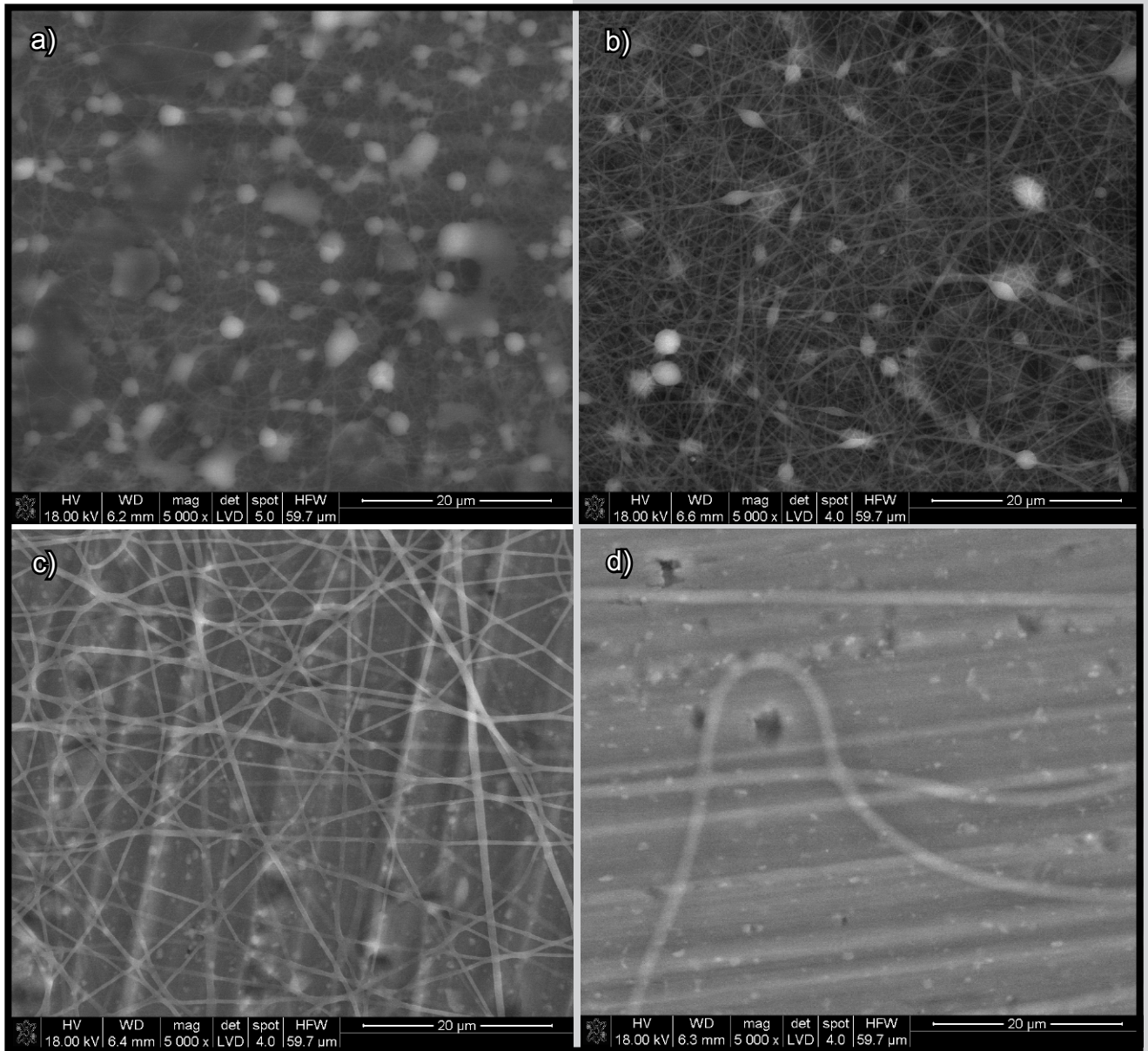
Electrospinning processing conditions applied for the gelatine fibre formation were the same as the ones for the PLA fibres. A series of experiments was performed in order to optimise the polymer concentration allowing for the formation of fibrous forms. As it can be concluded from the SEM microphotographs of nanofibres manufactured (FIG. 4) at lower gelatine concentrations (10 and 15%, FIG. 4a and b, respectively) the fibres formation was limited, and beads in the form of mats were formed along the structures obtained. On the other hand, for 25% polymer solution (FIG. 4d) the electrospinning process did not occur. Well-formed, defect-free and smaller in diameter fibres (with respect to PLA structures) were electrospun from 20% (wt/v) GEL solution (FIG. 5). The average fibre diameters are listed in TABLE 1. Sampled fibre diameters distribution (FIG. 3) shows that GEL fibres diameters range from 0.3 to 0.6 µm.

Layered deposits consisting of the PLA fibres (lower layer) and gelatine fibres (upper layer) were formed as well. The scheme of the process is presented in FIG. 6. The microscopic images of the materials performed in FIG. 7 display a well-formed fibrous material composed of two kinds of fibres creating a form of mat differing in their diameter sizes (FIG. 3). The microphotographs shown in FIG. 2 and 5 indicate that thicker fibres were formed from PLA (1.0 µm +/-0.2 µm) in comparison to gelatine fibres (0.6 µm +/-0.03 µm).



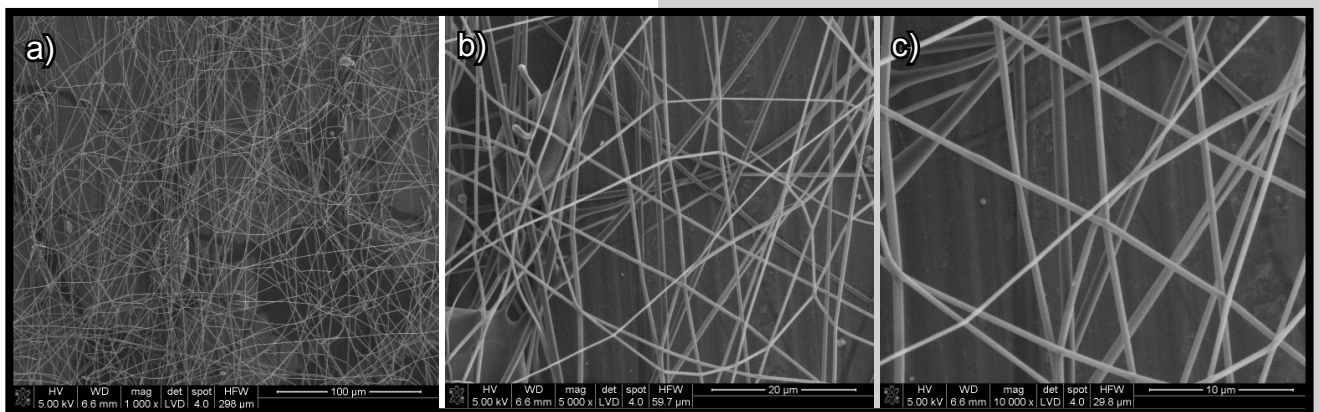
RYS. 3. Rozkład wielkości średnic włókien z PLA, GEL oraz warstwowego kompozytu PLA/GEL (dla igły 0,9 x 40,0 µm).

FIG. 3. Diameters distribution of PLA fibres, GEL fibres and layered PLA/GEL composite (needle 0.9 x 40.0 µm).



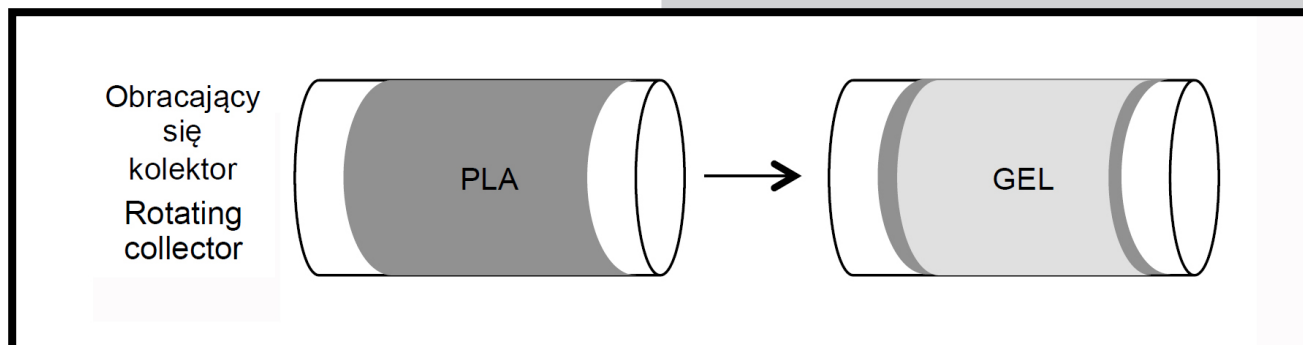
RYS. 4. Zdjęcia SEM włókien z żelatyny otrzymanych w wyniku elektroformowania z roztworu polimeru o stężeniu: a) 10, b) 15, c) 20 i d) 25% (wag./obj.) sporządzonego w stężonym CH_3COOH . Skala: 20 µm.

FIG. 4. SEM images of gelatine fibres electrospun from the: a) 10, b) 15, c) 20 and d) 25% (wt/v) polymer solution in concentrated CH_3COOH . Scale bars: 20 µm.



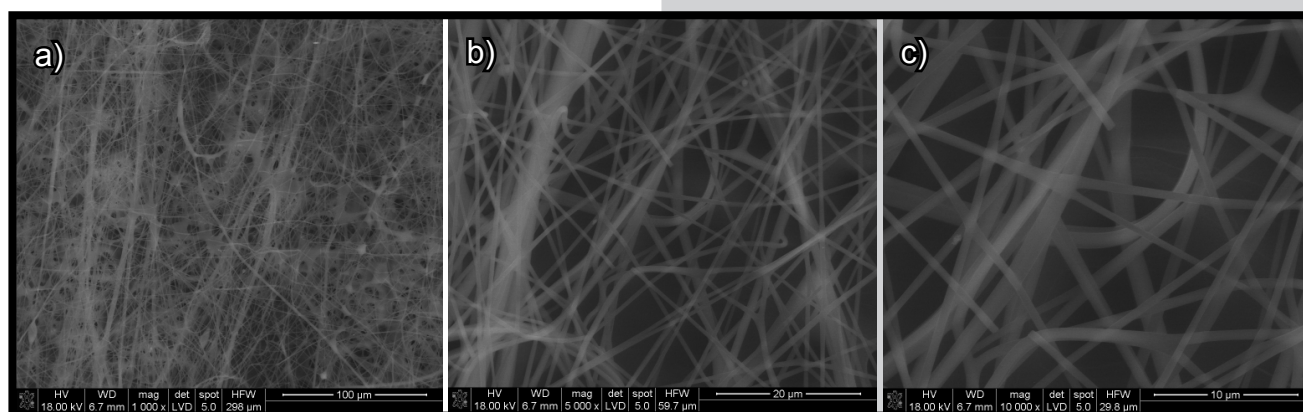
RYS. 5. Zdjęcia SEM włókien z żelatyny otrzymanych w wyniku elektroformowania z roztworu polimeru o stężeniu 20% (wag./obj.) sporządzonego w stężonym CH_3COOH . Skala: a) 100 µm, b) 20 µm, c) 10 µm.

FIG. 5. SEM images of gelatine fibres electrospun from the 20% (wt/v) polymer solution in concentrated CH_3COOH . Scale bars: a) 100 µm, b) 20 µm, c) 10 µm.



RYS. 6. Schemat obrazujący odkładanie metodą „warstwa po warstwie” włókien z PLA i żelatyny z wykorzystaniem techniki elektroformowania.

FIG. 6. The scheme depicting the layer-by-layer deposition of PLA and gelatine fibres by the electrospinning technique.



RYS. 7. Zdjęcia SEM warstwowego układu włókien z PLA/żelatyny otrzymanych w wyniku elektroformowania z 15% (wag./obj.) roztworu PLA sporządzonego w DCM, DMF 3:1 (stos. wag.) i 20% (wag./obj.) roztworu żelatyny w stężonym CH_3COOH . Skala: a) 100 μm , b) 20 μm , c) 10 μm .

FIG. 7. SEM images of layered PLA/gelatine fibres electrospun from the 15% (wt/v) PLA solution in DCM, DMF 3:1 (wt:wt) and 20% (wt/v) gelatine solution in concentrated CH_3COOH . Scale bars: a) 100 μm , b) 20 μm , c) 10 μm .

Przeprowadzono także doświadczenia odkładania, kolejno na kolektorze, włókien polilaktydowych (dolna warstwa) i żelatynowych (górną warstwą). Schemat prowadzonego procesu zamieszczono na RYS. 6. Zdjęcia SEM uzyskanych depozytów (RYS. 7) przedstawiają dobrze wykształcony materiał włóknisty zbudowany z dwóch rodzajów włókien, zróżnicowanych pod względem wielkości średnic (RYS. 3). Opierając się na wcześniejszych wynikach (RYS. 2 i 5) można założyć, iż grubsze włókna są zbudowane z PLA (1,0 μm +/- 0,2 μm), natomiast cieńsze z żelatyny (0,6 μm +/- 0,03 μm).

Wnioski

Celem omawianej pracy było otrzymanie włókien polilaktydowych i żelatynowych z wykorzystaniem techniki elektroformowania. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń udowodniono możliwość elektroformowania nanowłókien z różnych polimerów, stosując relatywnie niskie napięcie (12 kV). Dzięki wykorzystaniu metody warstwowego nakładania włókien różnych materiałów, otrzymano także hybrydowy układ PLA i żelatyny.

Podziękowania

Niniejsza praca była finansowana z funduszu badań statutowych prowadzonych na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH, projekt nr 11.11.160.256.

Conclusions

The aim of this work was to obtain the polylactide and gelatine fibers using the electrospinning technique. The experiments performed proved the possibility of electrospinning nanofibres of different polymeric materials using a relatively low-power supply (12 kV). The feasibility of layered deposition of PLA and gelatine via electrospinning and hence, obtaining composite material has been demonstrated.

Acknowledgements

This work has been supported by the Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH-UST, statute funds, project no 11.11.160.256.

Piśmiennictwo

- [1] Frenot A., Chronakis I.S.: Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 (2003) 64-75.
- [2] Chigome S., Torto N.: A review of opportunities for electrospun nanofibers in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* 706 (2011) 25-36.
- [3] Balamurugan R., Sundarajan S., Ramakrishna S.: Recent Trends in Nanofibrous Membranes and Their Suitability for Air and Water Filtrations. *Membranes* 1 (2011) 232-248.
- [4] Inagaki M., Yang Y., Kang F.: Carbon Nanofibers Prepared via Electrospinning. *Advanced Materials* 24 (2012) 2547-2566.
- [5] Zhang H., Yu M., Xie L., Jin L., Yu Z.: Carbon-Nanofibers-Based Micro-/Nanodevices for Neural-Electrical and Neural-Chemical Interfaces. *Journal of Nanomaterials* 2012 (2012) 280902.
- [6] Liu W., Thomopoulos S., Xia Y.: Electrospun Nanofibers for Regenerative Medicine. *Advanced Healthcare Materials* 1 (2012) 10-25.
- [7] Sas I., Gorga R.E., Joines J.A., Thoney K.A.: Literature Review on Superhydrophobic Self-Cleaning Surfaces Produced by Electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 50 (2012) 824-845.
- [8] Khadka D.B., Haynie D.T.: Protein- and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 (2012) 1242-1262.
- [9] Garlotta D.: A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment* 9 (2001) 63-84.
- [10] Ip W.Y.: Polylactide membranes and sponges in the treatment of segmental defects in rabbit radii. *Injury* 33 (2002) S-B-66-70.
- [11] Aliyeva E., Sakallioğlu U., Erena Z., Acikgoz G.: The effect of polylactide membranes on the levels of reactive oxygen species in periodontal flaps during wound healing. *Biomaterials* 25 (2004) 4633-4637.
- [12] Gugala Z., Gogolewski S.: Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury* 33 (2002) S-B-71-76.
- [13] Holzwartha J.M., Ma P.X.: Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 32 (2011) 9622-9629.
- [14] Levorson E.J., Sreerekha P.R., Chennazhi K.P., Kasper F.K., Nair S.V., Mikos A.G.: Fabrication and characterization of multi-scale electrospun scaffolds for cartilage regeneration. *Biomedical Materials* 8 (2013) 014103.

References

- [15] Mouthuy P.A., Ye H., Triffitt J., Oommen G., Cui Z.: Physico-chemical characterization of functional electrospun scaffolds for bone and cartilage tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine* 224 (2010) 1401-1414.
- [16] Lee Y.S., Arinzeh T.L.: Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers* 3 (2011) 413-426.
- [17] Gu S.Y., Wang Z.M., Ren J., Zhang C.Y.: Electrospinning of gelatin and gelatin/poly(L-lactide) blend and its characteristics for wound dressing. *Materials Science and Engineering: C* 29 (2009) 1822-1828.
- [18] Chiu J.B., Liu C., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M.: Functionalization of poly(L-lactide) nanofibrous scaffolds with bioactive collagen molecules. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 83A (2007) 1118-1127.
- [19] Torres-Giner S., Gimeno-Alcaniz J.V., Ocio M.J., Lagaron J.M.: Optimization of Electrospun Polylactide-Based Ultrathin Fibers for Osteoconductive Bone Scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 914-92.
- [20] Ratanavaraporn J., Damrongsakkul S., Sanchavanakit N., Banaprasert T., Kanokpanont S.: Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 16 (2006) 31-36.
- [21] Ladd M.R., Lee S.J., Stitzel J.D., Atala A., Yoo J.J.: Co-electrospun dual scaffolding system with potential for muscle-tendon junction tissue engineering. *Biomaterials* 32 (2011) 1549-1559.
- [22] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotakic M., Ramakrishna S.: A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63 (2003) 2223-2253.
- [23] Sundararaghavan H.G., Burdick J.A.: Gradients with Depth in Electrospun Fibrous Scaffolds for Directed Cell Behavior. *Biomacromolecules* 12 (2011) 2344-2350.
- [24] Socha A., Błażewicz M.: Microscopic studies of polylactide electrospun fibres designed for tissue engineering scaffolds. *Engineering of Biomaterials* 115 (2012) 12-17.

OCENA ODLEWÓW STOPU NIKLU W KONTEKŚCIE ICH PRZYDATNOŚCI PO ZASTOSOWANIU PROTETYCZNEGO ZŁOMU POPRODUKCYJNEGO

KAROLINA BEER-LECH^{1*}, KRZYSZTOF PAŁKA¹, JANUSZ BOROWICZ²

¹ KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
WYDZIAŁ MECHANICZNY, POLITECHNIKA LUBELSKA,
UL. NADBYSTRZYCKA 36, 20-618 LUBLIN

² UNIwersytet MEDYCZNY W LUBLINIE,
STOMATOLOGICZNE CENTRUM KLINICZNE,
ZAKŁAD PROTETYKI UNIwersytetu MEDYCZNEGO W LUBLINIE
UL. KARMELICKA 7, 20-081 LUBLIN

* E-MAIL: K.BEER@POLLUB.PL

Streszczenie

Trwałość i użyteczność metalowych podbudów stomatologicznych protez częściowych w środowisku organizmu ludzkiego, a w szczególności w warunkach obciążeń biomechanicznych występujących podczas żucia jest uwarunkowana ich jakością uzyskaną w procesie odlewania. Na jakość metalowych podbudów protez może mieć wpływ zarówno metoda odlewania jak i korzystanie w procesie odlewania z dodatku tzw. złomu poprodukcyjnego. Złom ten stanowić mogą metale lub ich stopy, które były już raz użyte w procesie odlewania, jak również pozostałości po obróbce protetycznej. Ze względów ekonomicznych większość laboratoriów protetycznych wykorzystuje złom poprodukcyjny jako część wsadu do kolejnego procesu odlewania protez jednak procedura ta może powodować zmianę właściwości mikrostrukturalnych i mechanicznych uzyskanych odlewów i wpływać na końcową jakość wytworzonych protez, skutkując również obniżeniem przyczepności ceramiki dentystycznej. Wyniki prezentowane w literaturze dla różnych badanych stopów nie są jednoznaczne.

Celem pracy była ocena jakościowa odlewów oraz analiza zmian mikrostruktury i składu chemicznego odlewów wykonanych ze stopu NiCrMo stosowanego do wytwarzania metalowych podbudów koron i mostów protetycznych z dodatkiem złomu poprodukcyjnego oraz dwóch metod odlewania protez.

Jako próbki do badań zastosowano jednokrotne przetopy stopu niklu o zawartości odpowiednio: 100, 50, 0% stopu fabrycznego oraz osrodkową i próżniowo-ciśnieniową metodę odlewania.

Wykonano badania mikrostrukturalne otrzymanych odlewów wraz z ich oceną jakościową i ilościową. Dla wszystkich badanych próbek stwierdzono obecność porów. Określono udział procentowy wydzielań występujących w stopach oraz ich skład chemiczny. Stwierdzono, że stop odlewany metodą próżniowo-ciśnieniową charakteryzuje się większym udziałem wydzielań niż stop odlewany za pomocą metody osrodkowej.

Słowa kluczowe: stopy niklu, biomateriały, złom poprodukcyjny, mikrostruktura, metody odlewania.

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 13-18]

EVALUATION OF NICKEL ALLOY CASTINGS IN THE CONTEXT OF THEIR RELEVANCE TO THE USE OF POST-PRODUCTION SCRAP APPLICATION

KAROLINA BEER-LECH^{1*}, KRZYSZTOF PAŁKA¹, JANUSZ BOROWICZ²

¹ LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING,
36 NADBYSTRZYCKA STR., 20-618 LUBLIN, POLAND

² MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN,
I FACULTY OF MEDICINE WITH DENTISTRY DIVISION,
7 AL. KARMELICKA STR., 20-081 LUBLIN, POLAND

* E-MAIL: K.BEER@POLLUB.PL

Abstract

Durability and serviceability of metal substructures of partial dentures in the environment of the human body, especially in the conditions of biomechanical loads encountered during chewing, is determined by the quality achieved in the casting process. The quality of the metal denture frameworks can affect both: the casting method and using of post-production scrap in the casting process. Prosthetic post-production scrap may be: metals or their alloys that were once already used in the casting process, as well as the remnants of the prosthetic treatment. For economic reasons, the majority of dental laboratories use post-production scrap as part of the batch to the next casting process, however, this practice may change microstructure and mechanical properties of the castings and affect the quality of the final prosthesis resulting also in the reduction of adhesion of dental ceramics. The results presented in the scientific literature for various tested alloys are ambiguous.

The aim of this study was to analyze the changes in the microstructure and chemical composition of castings made from NiCrMo alloy (used to manufacture the substructures of ceramic faced prosthetic crowns and bridges) applying post-production scrap and two methods of casting. As the test samples the disposable castings of Ni alloy was used, containing respectively 100, 50, 0% of new alloy.

The microstructure research, including quality and quantity analysis, was performed. For all tested samples the occurrence of pores was observed. The percentage ratio of precipitates, formed in the alloys and their chemical composition was determined. It was found that the alloy cast using vacuum pressure method has a greater share of the precipitates than alloy castings using a centrifugal method.

Keywords: nickel alloys, biomaterials, post-production scrap, microstructure, casting methods

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 13-18]

Wysoki koszt stopów złota jest przyczyną poszukiwania alternatywnych stopów dentystycznych, które mogą być zastosowane jedynie wtedy, gdy są bezpieczne dla pacjentów. Pomimo pojawienia się doniesień naukowych o szkodliwym wpływie niektórych metali na organizmy żywe, a w szczególności alergii spowodowanej oddziaływaniem stopów niklu, są one nadal powszechnie stosowane do wytwarzania podbudów stomatologicznych protez częściowych [1]. Nie ma wątpliwości, że stopy złota są bardziej zgodne biologicznie. Dane literaturowe wykazują jednak, iż stopy Ni-Cr są doskonałą alternatywą dla stopów szlachetnych do wykonywania protez licowanych ceramiką ze względu na wysoki moduł sprężystości stopu (ok. dwa razy większy niż w stopach złota). Umożliwia to zmniejszenie przekroju poprzecznego elementów oraz zapewnia większą przestrzeń dla porcelany i mniejsze zużycie zęba [2]. Liczne zalety stopu tj.: większa odporność na korozję [3], oraz zbliżone wartości współczynnika rozszerzalności cieplnej z porcelaną dentystyczną [4], a także niskie koszty wytwarzania protez sprawiają, że stopy te stanowią korzystną alternatywę dla innych stopów metali nieszlachetnych. Ponadto licowanie porcelaną zmniejsza istotnie ich cytotoxycyność [5].

Na końcową jakość stomatologicznych protez częściowych, typu korona czy most wpływają głównie: metoda odlewania [2] oraz stosowanie do odlewania materiałów powtórnie przetopionych [6-13]. Praktyka wykorzystywania tzw. złomu poprodukcyjnego jest atrakcyjną metodą obniżenia kosztów wytwarzania elementów protetycznych. Złom poprodukcyjny stanowią metale i stopy metali, które już raz były użyte w procesie wytwarzania elementów protetycznych. Ponadto właściwości ponownie przetopionych stopów dla stomatologii mogą różnić się od stopów fabrycznie nowych, co spowodowane jest zmianą składu chemicznego i mikrostruktury. Niektóre prace wskazują na niekorzystny wpływ na odporność korozyjną i właściwości mechaniczne stopów powtórnie przetopionych, oraz obniżenie wytrzymałości połączenia metal-porcelana dentystyczna [6-9]. W literaturze zwraca się również uwagę na wzrost cytotoxycyności stopów Ni-Cr, Co-Cr i Cu z dodatkiem przetopów wtórnych [10-11]. Inne prace [12-14] wskazują na znikomy wpływ stosowania przetopów wtórnych na mikrostrukturę, odporność na korozję, właściwości mechaniczne, oraz lejność, za to podkreślają duże korzyści ekonomiczne. Opisywane są głównie stopy Ti, Co i metali szlachetnych, natomiast niewiele jest danych na temat zmian w stopach Ni-Cr-Mo po powtórny przetopieniu. Jak dotąd brak jest w literaturze szczegółowej analizy jednoczesnego wpływu obu czynników: metody odlewania i zastosowania złomu poprodukcyjnego na morfologiczne zmiany w mikrostrukturze stopów NiCrMo stosowanych do wytwarzania protez licowanych ceramiką.

Celem pracy była ocena jakościowa odlewów oraz analiza zmian w mikrostrukturze i składzie chemicznym stomatologicznego stopu Ni-Cr-Mo z zastosowaniem złomu poprodukcyjnego i dwóch metod odlewania.

Materiały i metody

Do badań zastosowany został komercyjny stop stomatologiczny NiCrMo o składzie masowym: Ni: 59,3%, Cr: 24,0%, Mo: 10,0%, Fe: 1,5%, Mn: 1,5%, Ta: 1,5%, Si: 1,2% Nb: 1,0%. Stop ten jest zgodny z normą EN ISO 22674 i przeznaczony do wykonywania licowanych ceramiką lub kompozytem koron i mostów protetycznych.

Introduction

The high cost of noble metal alloys is causing the search for alternative dental alloys that can be applied only if they are safe for patients. Despite the emergence of scientific reports about the harmful effects of certain metals on living organisms, and in particular the impact of allergies caused by nickel alloys, they are still widely used in the manufacture of denture partial frameworks [1]. There is no doubt that gold alloys are more biocompatible. However scientific reports indicate that Ni-Cr alloys are an excellent alternative to noble metal alloys to manufacture ceramic faced dentures due to the high modulus of elasticity (approximately two times higher than its value for gold alloys). This reduces the cross-section of elements, and provides more space for dental ceramic and less wear of the tooth [2]. The numerous advantages of the alloy such as: higher corrosion resistance [3], and similar thermal expansion coefficient of dental ceramic [4], and low costs of dentures manufacturing make those alloys advantageous alternative in comparison to other metals. In addition, porcelain veneers significantly reduces their cytotoxicity [5].

The final quality of partial dentures: the crowns or bridges influenced mainly casting method [2] and the use recycled materials for the casting [6-13]. The practice of using "post-production scrap" is an attractive method of reducing the cost of prosthetic components manufacturing. The post-production scrap could be metals and their alloys that were once already used in the manufacture of prosthetic components. Scientific reports indicate that the properties of the recasted alloys for dentistry can vary from the brand new alloy, which is caused by the change in the chemical composition and microstructure. Some studies suggest an adverse effect of recasted alloys on the corrosion resistance and mechanical properties, as well as decrease in strength of the metal-dental porcelain bonding [6-9]. It is also noted an increase in cytotoxicity in Ni-Cr, Co-Cr and Cu alloys with the addition of recasted materials [10-11]. Other works [12-14] point an insignificant effect on the microstructure, corrosion resistance, mechanical properties, and fluidity, but emphasize the large economic benefits of the use of recasted alloys. There are mainly Ti alloys, Co and precious metals described, but little is known about changes in Ni-Cr-Mo after recasting. There is no detailed analysis in the literature of the influence of both factors simultaneously: the casting method and application of post-production scrap on the morphological changes in the microstructure of alloys used to the manufacture of NiCrMo ceramic faced prostheses.

The aim of this study was to assess the quality of castings and analysis of changes in the microstructure as well as chemical composition of dental Ni-Cr-Mo alloy using post-production scrap and two casting methods.

Materials and Methods

A commercial NiCrMo dental alloy of chemical composition (wt%) Ni: 59.3%, Cr: 24.0% Mo: 10.0%, Fe: 1.5%, Mn: 1.5%, Ta: 1.5%, Si: 1.2% Nb: 1.0% was used in this study. This alloy is in compliance with the standard EN ISO 22674 and designed to produce ceramic faced dentures.

Ze stopu wykonano walcowe odlewy o wymiarach: średnica 5 mm, wysokość 8 mm, stosując jednokrotne przetopy o składzie wyjściowym odpowiednio 0, 50 i 100% stopu fabrycznego. Formy ceramiczne do wytworzenia odlewów wykonano metodą wytapianych modeli stosując uniwersalną masę ceramiczną WiroFine (Bego). Odlewy wykonano dwiema metodami wypełniania formy odlewniczej: odśrodkową – przy użyciu odlewarki indukcyjnej ROTOCAST (Roko Dental Equipment) i próżniowo-ciśnieniową w urządzeniu Nautilus (Bego). Po usunięciu skorupy ceramicznej i odcięciu elementów układu wlewowego powierzchnię próbek piaskowano. Cały proces przeprowadzony był w warunkach pracowni protetycznej zgodnie z procedurami stosowanymi do wytwarzania podbudów protez częściowych.

Mikrostrukturę zglądów obserwowano przy użyciu optycznego mikroskopu metalograficznego Nikon MA 200 jak również skaningowego mikroskopu elektronowego Ultra Plus (Zeiss) z mikroanalizatorem EDX (Bruker). Analizę ilościową mikrostruktur wykonano z wykorzystaniem oprogramowania ImagePro Plus (Media Cybernetics). Do oceny stereologicznej przyjęto powierzchnię wydzielań i średnią średnicę jako parametry opisujące ich wielkość, parametr opisujący kształt wydzielań (stosunek średnic), oraz procentowy udział powierzchni wydzielań. Do analizy obrazu przyjęto obszar o powierzchni 0,12 mm², przy czym wyniki podano jako średnie z 5 miejsc obserwacji na 3 próbkach. Ocenę statystyczną wyników wykonano przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja

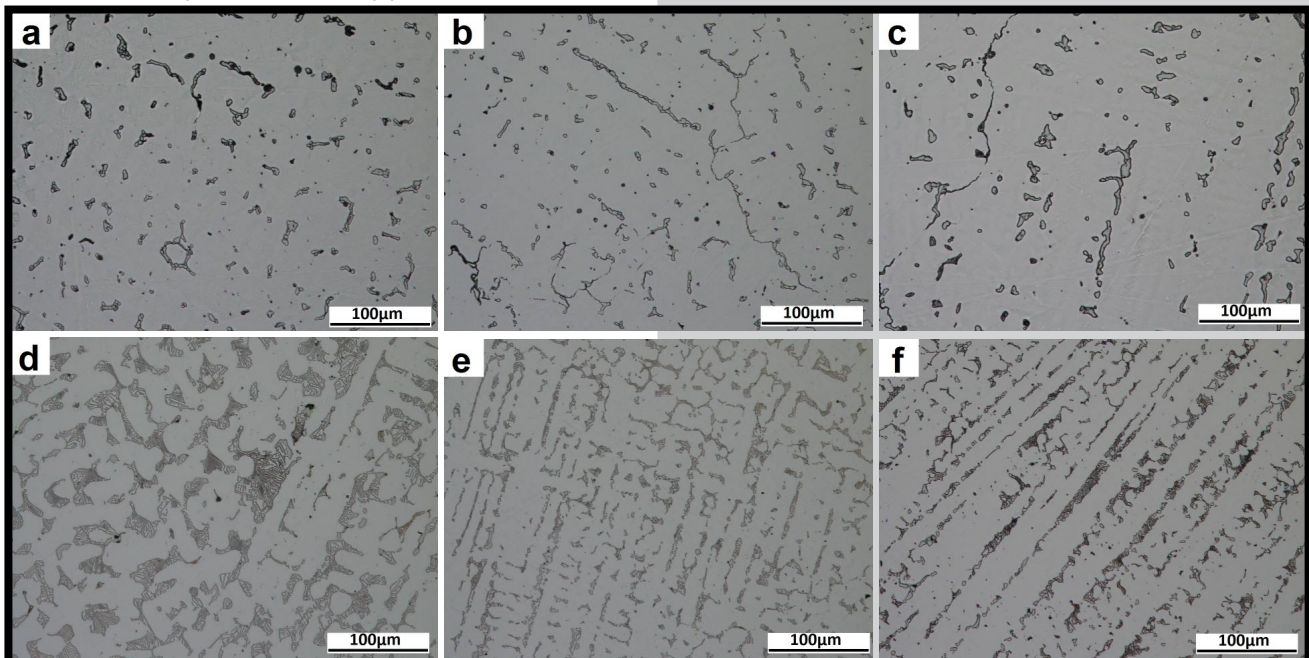
Na RYS. 1 zaprezentowano mikrostruktury badanego stopu wykonanego dwiema metodami oraz z różną zawartością złomu poprodukcyjnego. Obserwacje przekrojów badanych elementów, wykonanych zarówno metodą odśrodkową jak i próżniowo-ciśnieniową, wskazują na charakterystyczną strukturę odlewniczą z kierunkiem krystalizacji od zewnętrznej powierzchni wyrobu z zakończeniem krystalizacji w centrum wlewka. Wyraźnie uwidoczniła jest również dendrytyczna budowa odlewu.

Cylindrical castings with dimensions of: diameter 5 mm, height 8 mm, were made using single cast. Tested material contained respectively 0, 50 and 100% of new alloy. Ceramic molds to produce the castings were made by lost wax models method using the universal ceramic body WiroFine (Bego). Castings were made by induction centrifugal casting ROTOCAST (Roko Dental Equipment) and vacuum-pressure casting Nautilus (Bego). After removal of the ceramic shell and cut-off the elements of the gating system samples were sand blasted. The entire process of the manufacture was carried out in prosthetic lab in accordance with the procedures applicable to the manufacture of partial denture framework.

Microstructure of tested alloys was observed using optical microscope Nikon MA 200 as well as the scanning electron microscopy Ultra Plus (Zeiss) equipped with EDX analysis (Bruker). Quantitative analysis of microstructure was made using the ImagePro Plus software (Media Cybernetics). To evaluate the stereology there were used the ratio of precipitations area; parameters describing the size were area and mean diameter of precipitation and the shape of precipitation was described by ratio of min/max diameter. There were analyzed 5 regions of area 0.12 mm² each on 3 samples of every alloy. The statistical evaluation of the results was made at the significance level $\alpha = 0.05$.

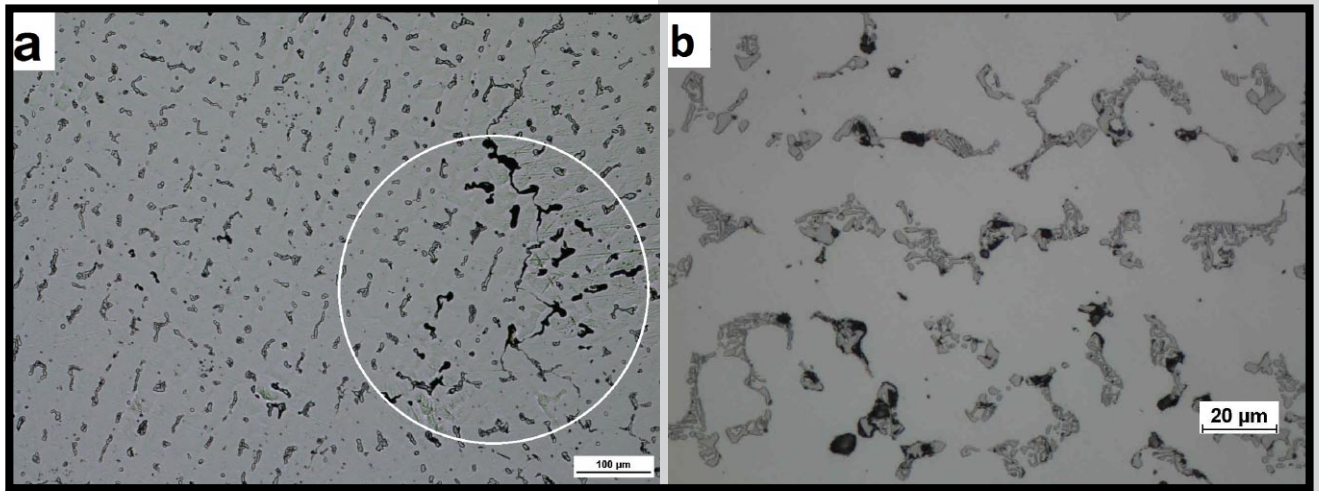
Results and Discussions

Microstructures of tested alloy made of two casting methods and with varying content of post-production scrap were presented in FIG. 1. Observation of cross sections of tested samples made by both methods (induction centrifugal casting and vacuum-pressure casting) show specific structure of cast with the direction of crystallization from the external surface of the product with the completion of the crystallization in the center of the ingot. A dendritic structure of the cast is also clearly visible.



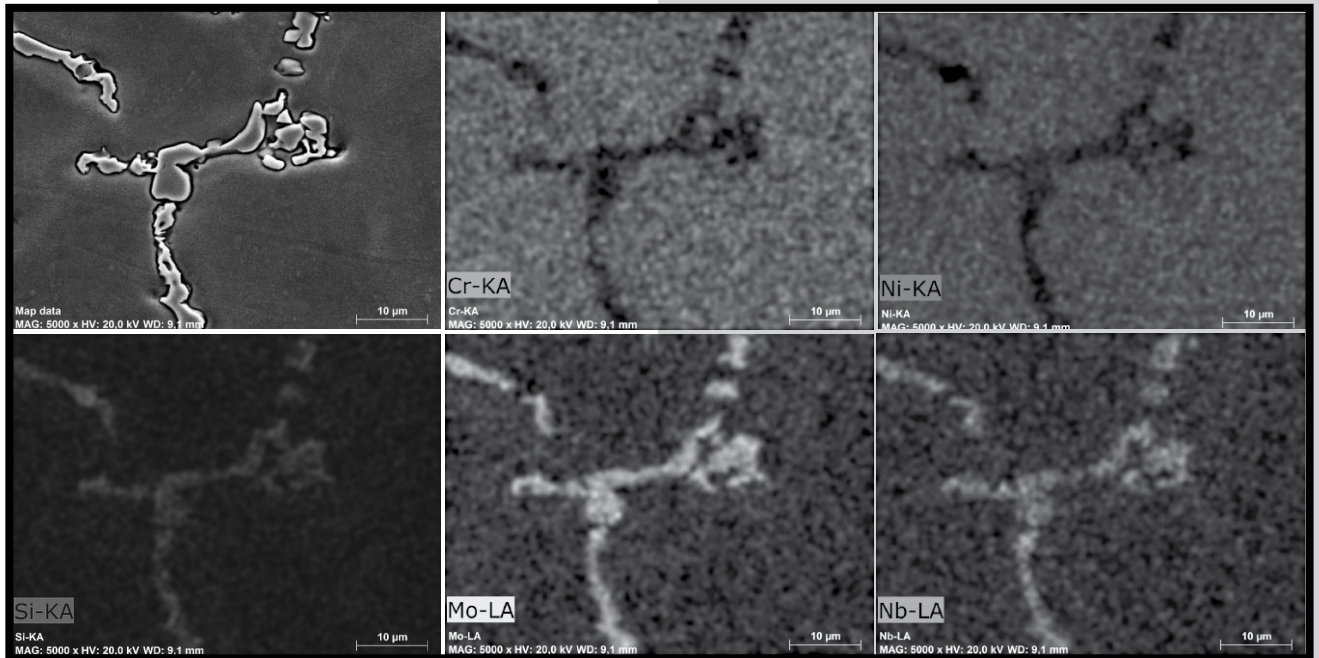
RYS. 1. Obrazy mikrostruktury badanego stopu: odlewy wykonane metodą odśrodkową zawierające odpowiednio: 0% (a), 50% (b), 100% (c) stopu fabrycznego; odlewy wykonane metodą próżniowo-ciśnieniową zawierające odpowiednio: 0% (d), 50% (e), 100% (f) stopu fabrycznego.

FIG. 1. Images of the microstructure of the tested alloy: castings made by centrifugal casting method, containing respectively: 0% (a), 50% (b) 100% (c) of ready-made alloy, castings made by the vacuum - pressure casting method containing respectively: 0% (d), 50% (e), 100% (f) of ready-made alloy.



RYS. 2. Porowość w mikrostrukturze badanego stopu: (a) odlew wykonany metodą odśrodkową; (b) odlew wykonany metodą próżniowo-ciśnieniową.

FIG. 2. Porosity in the microstructure of tested alloy: (a) made by centrifugal casting method; (b) made by the method of vacuum – pressure.



RYS. 3. Obrazy rozkładu pierwiastków w osnowie i wydzieleniach w odlewie zawierającym 0% stopu fabrycznego wykonanego metodą odśrodkową.

FIG. 3. Maps of elements distribution in matrix and precipitations in the cast containing 0% of new alloy, made by centrifugal casting method.

Pory i rzadziny obserwowane są głównie w centralnej części elementów i występują na poziomie mikrostruktury, szczególnie w przestrzeniach między dendrytami - RYS. 2. Jest to potwierdzeniem wysokiej jakości odlewniczej badanego materiału. Nie stwierdzono wpływu ilości materiału z recyklingu oraz sposobu odlewania na ilość, wielkość i morfologię porów.

Z powodu niewielkich wymiarów elementów prędkość chłodzenia stopu była dość duża, zwiększona dodatkowo w metodzie odśrodkowej przez ruch formy. W związku z tym struktury uzyskane w procesie wytwarzania różnią się od struktur układu równowagi opisanych w [15,16]. Strukturę stopów, dla obu zastosowanych metod odlewania, stanowi osnowa roztworu Ni-Cr-Mo z wydzieleniami faz międzymetalicznych i wydzieleniami bogatymi w Mo, Nb i Si przy niezmienionej w stosunku do osnowy zawartości Fe i Ta i znacznie zmniejszonej zawartości Ni i Cr (RYS. 3).

Porosity and shrinkage porosity are observed mainly in the central part of the elements and occur at the level of microstructure, particularly in the spaces between dendrites (FIG. 2). This is a confirmation of very good casting properties of the material tested. The effect of the amount of recycled material and the method of casting for the quantity, size and morphology of porosity was not observed.

Due to the small dimensions of specimens the speed of cooling was quite high, increased additionally in centrifugal method by movement of mold. Due to that, the obtained microstructures are different from the structures of the equilibrium system described in [15,16]. The microstructure of alloys, for both methods applied, is the Ni-Cr-Mo matrix with precipitations of intermetallic phases and other compounds rich in Mo, Nb, and Si, with not varying observed in contents of Fe and Ta and significantly decreased content of Ni and Cr (FIG. 3).

Tak silna segregacja pierwiastków może powodować, jak pisali autorzy Ameer M.A. i inni - inicjację procesów korozyjnych [7]. Nie zaobserwowano różnic w rozkładzie pierwiastków w osnowie i wydzieleniach międzidendrytycznych dla obu przedstawionych metod odlewania i różnej zawartości złomu poprodukcyjnego, a przykładowe wyniki oznaczeń rozkładu pierwiastków, wykonane dla metody odśrodkowej, zamieszczono na RYS. 3.

Różnice w składzie chemicznym odlewów nie wykazują istotności statystycznej. Obserwuje się zależność morfologii, ilości i wielkości wydzieleni i od zastosowanej metody odlewania, a w przypadku metody próżniowo-ciśnieniowej również bardzo silnie zaznacza się wpływ zawartości materiału z recyklingu (TABELA 1). Budowa wydzieleni dla metody odśrodkowej ma charakter blokowy (RYS. 2a, 3) natomiast dla metody próżniowo-ciśnieniowej – pasmowy (RYS. 2b). Wpływ metody odlewania na mikrostrukturę stopów niklu opisano również w pracach [17, 18]. Obie prace wskazują na obecność wydzieleni międzidendrytycznych zawierających Cr i Mo dla obu zastosowanych metod odlewania. Jednakże w niniejszych badaniach stwierdzono zmniejszoną ilość chromu w wydzieleniach. W pracy [17] wykazano, iż technika wypełnienia formy odlewniczej nie ma znaczącego wpływu na budowę wydzieleni, dla obu metod autorzy obserwowali wydzielenia pasmowe. Rozbieżności w uzyskiwanych wynikach mogą być rezultatem różnic w temperaturze zalewania oraz różnic w składzie chemicznym i strukturze materiału wyjściowego. Autorzy kontynuują badania w celu potwierdzenia tej tezy.

Ilość wydzieleni w przypadku metody odśrodkowej nie wykazuje istotnej statystycznie zależności od ilości materiału z recyklingu. Obserwuje się małą ilość wydzieleni (ok. 5%) o niewielkich rozmiarach (powierzchnia ok. 30 μm^2 , średnia średnica ok. 5 μm). W przypadku metody próżniowo-ciśnieniowej ilość wydzieleni maleje wraz ze zmniejszeniem udziału materiału z recyklingu, przy czym jest to różnica istotna statystycznie.

Such strong segregation of elements may initiate corrosion processes [7]. Differences in the distribution of elements in the matrix as well as in the interdendritic precipitates, for both used casting methods and various content of post-production scrap, were not noticed. Representative results of the element distribution, made for the centrifugal method are given in FIG. 3.

Differences in the chemical composition of castings do not show statistical significance. There is observed a dependence of morphology, size and quantity of precipitations and the casting method used. In the case of the vacuum-pressure casting method there was also noted very strong influence of the content of recycled material on precipitations morphology (TABLE 1). In the centrifugal method precipitations were formed in block shape (FIG. 2a, 3) and in the vacuum-pressure method – in shape of band (FIG. 2b). Effect of casting methods on microstructure of nickel alloys is described also in works [17 and 18]. Both works indicate the presence of interdendritic precipitations containing Cr and Mo for both casting methods used. However, these studies have found reduced amount of chromium in precipitations. Work [17] showed that the casting method had no significant impact on precipitations formation. Divergence in results may be due to differences in temperature of melted metal and/or in chemical composition of the starting material and the presence of refractory compounds. The authors continue the study in order to confirm this thesis.

The amount of precipitations in the case of alloy produced by centrifugal method showed no statistically significant correlation on the quantity of the recycled material. There is a small amount of precipitations (approximately 5%) of the small sizes (area approx. 30 μm^2 , the mean diameter of 5 μm). In the vacuum-pressure method the amount of precipitates decreases with reducing of content of the recycled material, and this difference is statistically significant.

TABELA 1. Parametry mikrostruktury uzyskane z analizy obrazu.
TABLE 1. Parameters of microstructure obtained from image analysis.

	Powierzchnia Area [μm^2]	Stosunek max/min. średnicy Ratio of max/min diameter	Średnica Diameter [μm]	Udział powierzchni wydzieleni Ratio of precip. area [%]	Powierzchnia Area [μm^2]	Stosunek max/min. średnicy Ratio of max/min diameter	Średnica Diameter [μm]	Udział % wydzieleni % ratio of precip. area
	metoda odśrodkowa, 0% centrifugal method, 0%				metoda próżniowo-ciśnieniowa, 0% vacuum pressure method, 0%			
Średnia / Mean	27.27	1.98	5.61	5.11	93.45	2.27	9.03	21.01
Odch. std. / Std.dev.	39.60	1.01	4.86	0.34	217.35	1.11	10.49	1.85
Przedz. ufn. $\alpha=0.05$ Conf. interval	± 5.27	± 0.14	± 0.65	± 0.29	± 26.269	± 0.135	± 1.27	± 1.62
	metoda odśrodkowa, 50% centrifugal method, 50%				metoda próżniowo-ciśnieniowa, 50% vacuum pressure method, 50%			
Średnia / Mean	18.09	2.21	4.91	4.59	30.42	2.29	5.69	14.72
Odch. std. / Std.dev.	37.38	1.63	6.94	0.32	48.14	1.18	4.87	0.41
Przedz. ufn. $\alpha=0.05$ Conf. interval	± 4.27	± 0.18	± 0.79	± 0.28	± 3.97	± 0.09	± 0.40	± 0.36
	metoda odśrodkowa, 100% centrifugal method, 100%				metoda próżniowo-ciśnieniowa, 100% vacuum pressure method, 100%			
Średnia / Mean	37.18	1.89	6.79	5.27	32.47	2.38	5.78	12.53
Odch. std. / Std.dev.	56.59	1.03	6.08	0.49	63.30	1.43	5.49	0.54
Przedz. ufn. $\alpha=0.05$ Conf. interval	± 8.66	± 0.16	± 0.93	± 0.43	± 5.84	± 0.13	± 0.507	± 0.47

Może to wskazywać na obecność nierozpuszczonych, wysokotopliwych związków (węgliki, tlenki, fazy międzymetaliczne), pozostałych z poprzednich procesów wytwarzania, które zwiększają rozmiary zarodków krystalizacji. Dodatkowo wydłużony czas chłodzenia (metoda próżniowo-ciśnieniowa) sprzyja tworzeniu dużej ilości wydzielań (ponad 12%) o dużych rozmiarach ($30\div 90 \mu\text{m}^2$) i nieznacznie wydłużonym kształcie w stosunku do metody odśrodkowej. Uzyskane wyniki wykazują duży rozrzut wartości spowodowany dużym zakresem wielkości powierzchni wydzielań, który wynosił od ok. $1 \mu\text{m}^2$ do nawet $500 \mu\text{m}^2$. Większa ilość wydzielań, zwłaszcza dużych rozmiarowo, może przyczynić się do obniżenia właściwości wytrzymałościowych i odporności korozyjnej [7].

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz sformułowano następujące wnioski:

1. Stop NiCrMo wykazuje niską porowatość na poziomie mikrostruktury, nie stwierdzono wpływu ilości materiału z recyklingu na ilość, wielkość i morfologię porowatości niezależnie od metody wykonania.
2. Nie zaobserwowano różnic w rozkładzie pierwiastków w osnowie i wydzieleniach międzydendrytycznych dla obu przedstawionych metod odlewania i różnej zawartości złomu poprodukcyjnego.
3. Obserwuje się zależność morfologii, ilości wydzielań i ich wielkości od metody odlewania stopu, a w przypadku metody próżniowo-ciśnieniowej bardzo silnie zaznacza się wpływ zawartości materiału z recyklingu. W związku z tym korzystne jest stosowanie metody odśrodkowej odlewania przy stosowaniu dodatku złomu poprodukcyjnego.

Podziękowania

Badania naukowe realizowane w powyższej pracy zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki ramach projektu badawczego „Preludium” nr 2011/01/N/ST8/07774.

This may indicate the presence of undissolved, refractory compounds (carbides, oxides, intermetallic phases) remaining from previous manufacturing processes that increase the size of the crystal nuclei. In addition, prolonged cooling (the vacuum-pressure method) favors the creation of a large number of precipitations (over 12%) of large sizes (area range of $30\div 90 \mu\text{m}^2$) and slightly elongated shape in relation to the centrifugal method. The results show a large scatter of values due to the large size range of surface precipitates, which ranged from about $1 \mu\text{m}^2$ to even $500 \mu\text{m}^2$. The greater amount of precipitations, especially large-sized, can contribute to a reduction in strength properties and corrosion resistance [7].

Conclusions

On the basis of the research and analyses, the following conclusions were formulated:

1. NiCrMo alloy showed low porosity at the level of microstructure; there was no impact observed of the amount of recycled material on the quantity, size and morphology of pores, regardless of the casting method.
2. There were observed no differences in the distribution of elements in the matrix and in precipitations for both casting methods and different post-production scrap content.
3. There is a dependence of morphology, the amount of precipitations and their size from casting method, and, in the case of the vacuum-pressure method, there is a very strong influence of the content of recycled material. According to this it is beneficial application of centrifugal method in castings containing post-production scrap.

Acknowledgments

This article was created as a part of a research project of the National Science Centre – “Prelude” No. 2011/01/N/ST8/07774.

Piśmiennictwo

- [1] Yin Lu et al.: Nickel-based (Ni-Cr and Ni-Cr-Be) alloys used in dental restorations may be a potential cause for immune-mediated hypersensitivity. *Medical Hypotheses* 73 (2009) 716-717.
- [2] Bauer J. et al.: Characterization of two Ni-Cr dental alloys and the influence of casting mode on mechanical properties. *Journal of Prosthodontics Research* 56 (2012) 264-271.
- [3] Benatti O.F. et al.: In vitro and in vivo corrosion evaluation of nickel-chromium- and copper-aluminum-based alloys. *J Prosthet Dent* 84 (2000) 360-363.
- [4] Atsu S., Berksun S.: Bond strength of three porcelains to two forms of titanium using two firing atmospheres. *J Prosthet Dent* 84 (2000) 567-574.
- [5] Reddy N.R. et al.: An In vitro Analysis of Elemental Release and Cytotoxicity of Recast Nickel-Chromium Dental Casting Alloys. *J Indian Prosthodont Soc* 2 (2011) 106-112.
- [6] Al-Ali A.: Evaluation of macrohardness of recasted cobalt-chromium alloy. *Al-Rafidain Dent J* 7, 1 (2007) 111-117.
- [7] Ameer M.A. et al.: Electrochemical behavior of recasting Ni-Cr and Co-Cr non precious dental alloys. *Corrosion Science* 46 (2004) 2825-2836.
- [8] Ayad M.F. et al.: Corrosion behavior of as-received and previously cast high noble alloy, *The Journal of Prosthetic Dentistry* 100, 1 (2008) 34-39.
- [9] Ucar Y. et al.: Metal ceramic bond after multiple castings of base metal alloy. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 102, 3 (2009) 165-171.

References

- [10] Al-Hiyasat A.S., Darmani H.: The effects of recasting on the cytotoxicity of base metal alloys. *The Journal of Prosthetics Dentistry* 93, 2 (2005) 158-163.
- [11] Imirzalioglu P. et al.: Influence of recasting different types of dental alloys on gingival fibroblast cytotoxicity. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 107, 1 (2012) 24-33.
- [12] Bauer J. et al.: The use of recycled metal in dentistry: Evaluation of mechanical properties of titanium waste recasting. *Resources, Conservation and Recycling* 54 (2010) 1312-1316.
- [13] Horasawa N., Marek M.: The effect of recasting on corrosion of a silver – palladium alloy. *Dental Materials* 20 (2004) 352-357.
- [14] Palascas J. et al.: Effect of Recasting of Nickel-Chromium Alloy on its Castability. *J Indian Prosthodont Soc* 10, 3 (2010) 160-164.
- [15] Davis J.R. (ed.), *ASM Specialty Handbook: Nickel, Cobalt, and Their Alloys*. ASM International, Materials Park, Ohio, 2000.
- [16] Turchi P.E.A., et al.: Modeling of Ni-Cr-Mo based alloys: Part I - phase stability. *Computer Coupling of Phase Diagrams and Thermochemistry* 30 (2006) 70-87.
- [17] Viswanathan S. Saji et al: Preferential dissolution behaviour in Ni-Cr dental cast alloy. *Bull. Mater.* 33, 4 (2010) 463-468.
- [18] Silva J.W.J. et al: Electrochemical and Microstructural Study of Ni-Cr-Mo Alloys Used in Dental Prostheses. *Materials Sciences and Applications* 2 (2011) 42-48.

CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA PORCELAN NISKOTOPLIWYCH STOSOWANYCH W TYTANOWYCH POŁĄCZENIACH DLA STOMATOLOGII

MAŁGORZATA LUBAS*, MONIKA GŁĘBICKA, ZBIGNIEW BALAGA,
CEZARY KOLAN, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZĘSTOCHOWA
* E-MAIL: MLUBAS@WIP.PCZ.PL

Streszczenie

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań składu fazowego, chemicznego oraz morfologii podstawowych proszków porcelany niskotopliwej firmy Duceratin Kiss Degudent firmy DeguDent, przeznaczonej do licowania szkieletów z tytanu i stopów tytanowo-niobowych oraz porcelany Initial Ti (Ti/Entrance Kit) firmy GC, stosowanej wyłącznie do uzupełnień na podbudowie z tytanu.

W pracy przedstawiono analizę porównawczą składu chemicznego oraz morfologii podstawowych proszków wchodzących w skład w/w porcelan dentystycznych. W badaniach zastosowano dyfrakcję rentgenowską (XRD) oraz mikroskopię skaningową wraz z mikroanalizą (SEM/EDS).

Badania stomatologicznej porcelany niskotopliwej różnych producentów wykazały, że skład podstawowych proszków bazuje na krzemianach i glino-krzemianach sodowo-potasowych o dość niskim stopniu krystaliczności. Obecność faz krystalicznych stwierdzono tylko dla proszków Opaque zarówno w porcelanie niskotopliwej Duceratin, jak i Initial Ti. Dla porcelany Duceratin fazy krystaliczne występują w postaci tlenku ceru, a dla porcelany Initial Ti jako tlenek cyny. Ponadto w obu proszkach na podstawie analizy rentgenograficznej stwierdzono występowanie tlenków ZrO_2 lub TiO_2 . Badania morfologii wykazały duże zróżnicowanie wielkości ziaren w poszczególnych proszkach porcelanowych. Największe, pojedyncze ziarna $> 70 \mu m$ zaobserwowano w proszku Opaqus Dentin (OD-A3) Initial Ti, a najmniejsze $< 10 \mu m$ w proszku Opaque Duceratin.

Słowa kluczowe: niskotopliwa porcelana dentystyczna, tytan, struktura, morfologia proszków

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 19-24]

Wprowadzenie

Leczenie protetyczne bazuje na metalach i ich stopach, materiałach ceramicznych, tworzywach sztucznych oraz materiałach kompozytowych. Materiały te wykorzystywane są przede wszystkim do protez, wszczepów filarowych oraz wypełnień zębowych. Różnią się one właściwościami, a najlepsze efekty daje ich łączenie. Największą odporność mechaniczną uzyskuje połączenie metal-ceramika.

COMPARISON BETWEEN LOW-MELTING PORCELAIN USED IN TITANIUM FRAMEWORKS IN DENTISTRY

MAŁGORZATA LUBAS*, MONIKA GŁĘBICKA, ZBIGNIEW BALAGA,
CEZARY KOLAN, JÓZEF JASIŃSKI, LEOPOLD JEZIORSKI

CZESTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
INSTITUTE FOR MATERIAL ENGINEERING
AL. ARMII KRAJOWEJ 19, 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND
* E-MAIL: MLUBAS@WIP.PCZ.PL

Abstract

The study presents the results obtained during examinations of phase and chemical composition and morphology of basic powders of low-melting porcelain Duceratin Kiss manufactured by DeguDent and Initial Ti (Ti/Entrance Kit) manufactured by GC. Duceratin is used for veneering of titanium frameworks and titanium-niobium alloys. Initial Ti (Ti/Entrance Kit) is dedicated exclusively to titanium-based fillings.

This study shows a comparative analysis of the microstructure, chemical composition and morphology of basic powders present in the above listed dentistry porcelains. The study used the X-Ray Diffraction (XRD) and scanning electron microscopy method with microanalysis (SEM/EDS).

Characterization of the dental low-melting porcelain from different manufacturers revealed that the basic composition of powders is based on sodium-potassium silicates and aluminosilicates with considerably low degree of crystallinity. Presence of crystalline phases was found only for Opaque powder, both in Duceratin porcelain and in Initial Ti. They performed the role of opacifiers, such as cerium oxide in Duceratin porcelain and tin oxide in Initial Ti. Furthermore, both powders also contain ZrO_2 and TiO_2 . Addition of such oxides improves opacity of porcelain layers. The examinations of powder morphology revealed high difference in grain size in individual porcelain powders. The biggest individual grains ($> 70 \mu m$) were observed in the powder Opaqus Dentin (OD-A3) Initial Ti, whereas the smallest grains ($< 10 \mu m$) were found in the powder Opaque Duceratin.

Keywords: low-melting dental porcelain, titanium, structure, powders morphology

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 19-24]

Introduction

Prosthetic treatment procedures in dentistry are mainly based on the use of metals and their alloys, ceramic materials, plastics and composite materials. These materials are used mainly for dentures, column implants and tooth fillings. They differ in their properties while the best effects are produced by combination of these materials. The highest mechanical strength is obtained for combination of metals and ceramics.

Materiały metaliczne pełnią bardzo ważną rolę ze względu na zdolność do przenoszenia obciążeń mechanicznych, czyli przejmowana naprężeń rozciągających oraz momentów zginających. Jedyną wadą jest korozja metali w środowisku śliny i płynu tkankowego. Z kolei materiały ceramiczne cieszą się dużym zainteresowaniem w protektyce stomatologicznej ze względu na biokompatybilność, wysoką odporność korozyjną w płynach ustrojowych, niskie przewodnictwo cieplne, dużą wytrzymałość mechaniczną i dobre właściwości estetyczne [1,2].

W technice dentystrycznej szerokie zastosowanie znalazł tytan. Jest to materiał biozgodny, a zarazem wytrzymały na obciążenia, jakim podlegają korzenie naturalnych zębów. Do najważniejszych cech tytanu należą: wysoka wytrzymałość mechaniczna, mała gęstość oraz niski moduł Younga. Tytan i jego stopy, zwłaszcza nowej generacji, są biointegralne i bioaktywne. Zdolność tytanu do łączenia z tkanką kostną jest wykorzystywana w stomatologii do implantów zębowych głównie jako nakłady i wkłady, szkielety protez częściowych, mezo- i suprastruktury konstrukcji wszczepowych, korony i mosty licowane oraz korony teleskopowe z utwardzaną powierzchnią [3].

Najlepszym materiałem licującym konstrukcje metalowe w stomatologii jest porcelana dentystryczna. Ze względu na zakres temperatur wypalania na podłożu metalowym podzielona została na: niskotopliwą (871-1066°C), średniotopliwą (1093-1260°C), wysokotopliwą (1288-1371°C) [4]. Najnowsze gatunki porcelany mają jeszcze niższy zakres temperatur wypalania: 700-850°C i nazywane są ultra niskotopliwymi [5]. Połączenie tytanu z porcelaną dentystryczną jest możliwe dzięki temu, że oba biomateriały są całkowicie obojętne. Umożliwia to sporządzanie całkowitych lub częściowych protez dla pacjentów uczulonych bądź wrażliwych na tworzywa sztuczne i metale. Konstrukcje tytanowe są pokrywane ultra niskotopliwą porcelaną dentystryczną uzyskując wymagane właściwości wytrzymałościowe oraz estetyczne [6,7].

Celem pracy była analiza porównawcza mikrostruktury, składu chemicznego oraz morfologii proszków wchodzących w skład niskotopliwej porcelany dentystrycznej przeznaczonej do połączeń wykonanych z tytanu i ze stopów tytanowych. W badaniach zastosowano porcelaną niskotopliwą Duceratin Kiss firmy DeguDent oraz Ti/Entrance Kit (Initial Ti) firmy GC.

Materiały i Metody

W pracy wykorzystano dwa zestawy faz proszkowych porcelany niskotopliwej:

- Duceratin Kiss firmy DeguDent podstawowe proszki: Opaque (OA 3), Dentin (DA 3), Bond.

- Initial Ti Ti/Entrance Kit) firmy GC proszki: Opaque (O-A3), Opaqus Dentin (OD-A3), Dentin (D-A3).

Skład fazowy wybranych proszków zbadano metodą dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Zastosowano dyfraktometr rentgenowski X-RAY DIFFRACTION SYSTEM SEIFERT XRD 3003 z lampą kobaltową w zakresie kąta 2θ 20°-100°. Badania morfologii podstawowych proszków porcelan i ich analizy chemiczne w mikroobszarach przeprowadzono na elektronowym mikroskopie skaningowym JSM 6610LV firmy Jeol z przystawką EDS. Proszki nanoszono na taśmę przewodzącą i napyłano węglem grafitowym. Analizę geometryczną wielkości cząstek (średnica) proszków przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania do analizy obrazu Image Pro Plus3.

Metallic materials perform an important role due to their ability of transferring mechanical load i.e. overtaking tensile stresses and bending moments. Their only drawback is corrosion in the environment of saliva and tissue fluids. As for ceramic materials, they have attracted much interest in prosthodontics due to their biocompatibility, high resistance to corrosion in body fluids, low thermal conductivity, high mechanical strength and good aesthetic properties [1,2].

Titanium is among the most commonly used materials in dentistry. This material is biocompatible and exhibits high strength, suitable for the load the roots of natural teeth are exposed to. The most important characteristics of titanium are: low weight, high mechanical strength, low density and low Young's modulus. Titanium and its alloys, with particular focus on new-generation alloys, are biointegral and bioactive. Titanium's capability of integration with bone tissue is used in dental implants, primarily as inlays, onlays, frameworks of partial dentures, meso- and suprastructures of implants, dental crowns and veneered bridges and telescope crowns with hardened surface [3].

The best veneering material for metal frameworks in dentistry is dental porcelain. In general, dental ceramics may be divided into low-melting (871 to 1066°C), medium-melting (1093 to 1260°C) and high-melting (1288 to 1371°C) [4]. The most recent porcelain grades exhibit even lower range of temperature of burning i.e. 700 to 850°C and are named ultra-low-melting [5]. Connection of titanium and dental porcelain is possible because both biomaterials are entirely neutral. This allows for preparation of total or partial dentures for patients who are allergic to or sensitive to plastics and metals. Titanium frameworks are covered with ultra-low-melting dental porcelain and obtain the required strength and aesthetic properties [6,7].

The aim of the study was comparative analysis of the microstructure, chemical composition and morphology of basic powders contained in low-melting porcelain for titanium and titanium alloy frameworks used in dentistry. Low-melting porcelain Duceratin Kiss manufactured by DeguDent and Initial Ti (Ti/Entrance Kit) manufactured by GC were used in the study.

Material and Methods

The study used two sets of basic powders of low-melting porcelain:

- Duceratin Kiss by DeguDent, with basic powders: Opaque (OA 3), Dentin (DA 3), Bond.

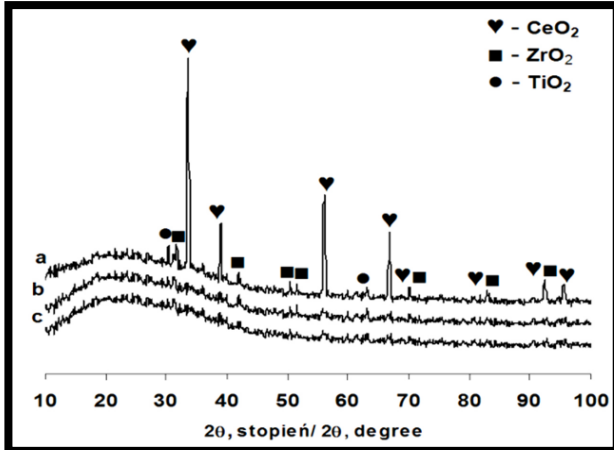
- Initial Ti (Ti/Entrance Kit) by GC, with powders: Opaque (O-A3), Opaqus Dentin (OD-A3), Dentin (D-A3).

Phase composition of the selected powders was analysed by means of X-ray diffraction (XRD). X-RAY DIFFRACTION SYSTEM SEIFERT XRD 3003 with cobalt lamp and 2θ angle of 20° to 100° was used in the study. Morphology of basic powders of porcelain and chemical analyses of these powders were carried out using scanning electron microscope JSM 6610LV (Jeol) with an EDS device. Powders were applied on the conducting tape and sputter-coated with graphite carbon. The geometrical analysis of particle size powder was realized with Image Plus software.

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki analizy rentgenograficznej dla wybranych, podstawowych proszków porcelan niskotopliwych Duceratin oraz Initial Ti przedstawiono odpowiednio na RYS. 1 i 2.

Na podstawie wyników badań rentgenowskich niskotopliwej porcelany Duceratin stwierdzono, że wszystkie proszki charakteryzują się podniesieniem tła w zakresie kątowym 20-35 2θ, co świadczy o obecności krzemianowej i glinokrzemianowej fazy amorficznej. Proszki Dentin (DA 3) i Bond nie zawierają faz krystalicznych. Tylko proszek Opaque (OA 3) obok fazy amorficznej ujawnił obecność faz krystalicznych, głównie w postaci tlenków: CeO_2 , ZrO_2 i TiO_2 .



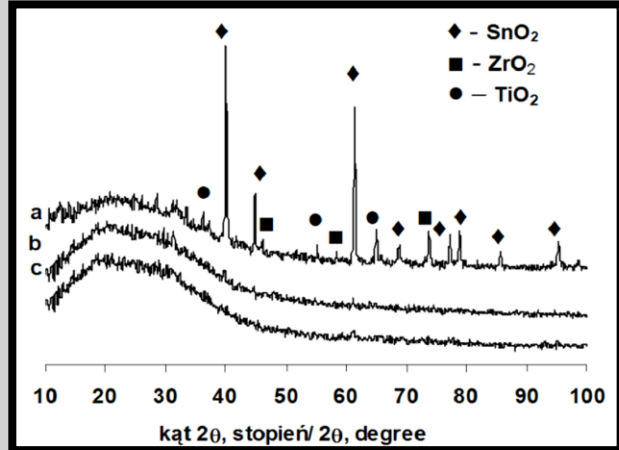
RYS. 1. Dyfraktogramy rentgenowskie proszków dla porcelany Duceratin: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (DA 3), c) Bond.

FIG. 1. X-ray patterns of the powders Duceratin porcelain: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (DA 3), c) Bond.

Results and Discussion

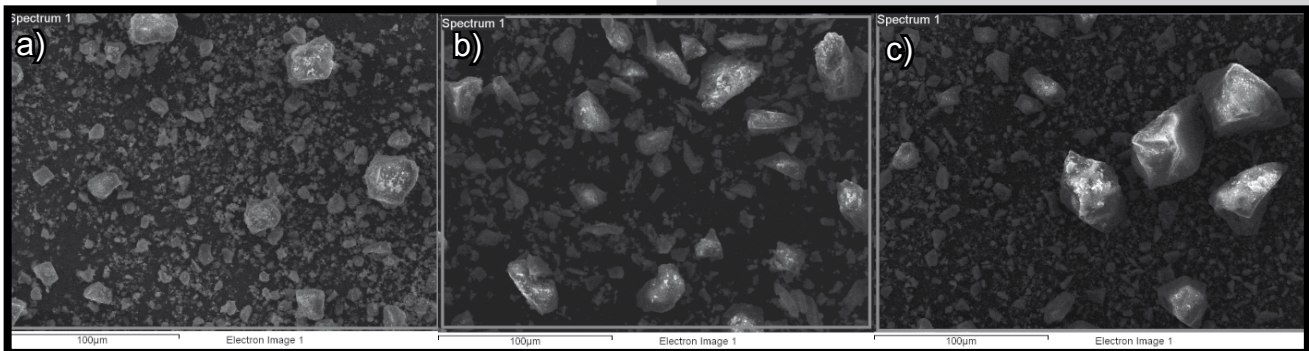
The results of X-ray analysis for selected basic powders of low-melting porcelains Duceratin and Initial Ti are presented in FIGs 1 and 2, respectively.

The results obtained from the X-ray analysis for low-melting porcelain Duceratin showed that all the powders are characterized by elevated background in the angular range of 20 to 35 2θ, which suggests presence of silicate and aluminosilicate amorphous phase. Dentin (DA 3) and Bond Powders do not contain crystalline phases. Apart from amorphous phase, only Opaque (OA 3) powder revealed presence of crystalline phases (mainly in the form of oxides CeO_2 , ZrO_2 and TiO_2).



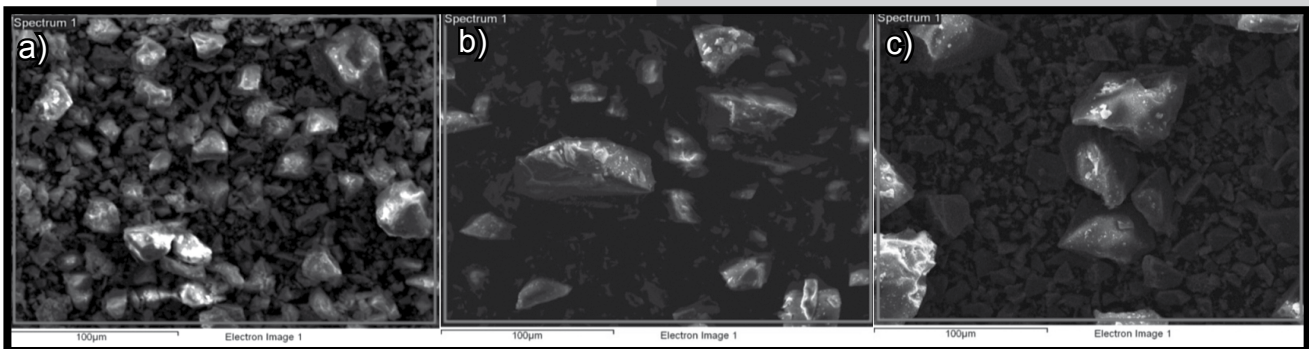
RYS. 2. Dyfraktogramy rentgenowskie proszków dla porcelany Initial Ti: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentine (D-A3).

FIG. 2. X-ray patterns of the powders Initial Ti porcelain: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentine (D-A3).



RYS. 3. Morfologia proszków porcelany niskotopliwej Duceratin: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (DA 3), c) Bond.

FIG. 3. Morphology of powders of low-melting porcelain Duceratin: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (DA 3), c) Bond.



RYS. 4. Morfologia proszków porcelany niskotopliwej Initial Ti: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentine (D-A3).

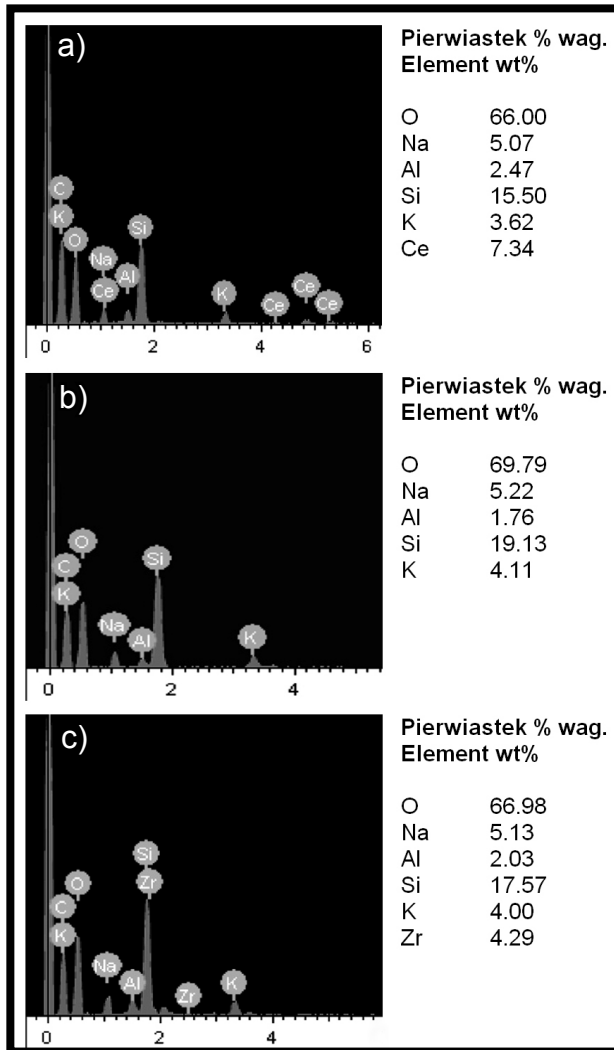
FIG. 4. Morphology of powders of low-melting porcelain Initial Ti: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentine (D-A3).

W przypadku porcelany niskotopliwej Initial Ti analiza rentgenograficzna, podobnie jak dla proszków Duceratin wykazała obecność fazy amorficznej we wszystkich proszkach (widoczne podwyższenie tła w zakresie 20-35 2θ). Dla proszku Opaque Initial Ti stwierdzono obecność refleksów pochodzących od faz krystalicznych takich jak: SnO₂, ZrO₂ i TiO₂.

Charakterystyczne podniesienie tła w przypadku obecności fazy amorficznej dla proszku Opaque zarówno porcelany Duceratin oraz Initial Ti jest mniej wyraźne niż dla pozostałych proszków, co świadczy o większym udziale faz krystalicznych.

Przeprowadzone badania morfologii proszków porcelany niskotopliwej Duceratin wykazały, iż proszki: Opaque (OA 3) oraz Dentin (DA 3) składają się z dużej ilości ziaren o wielkości 2-10 μm oraz ziaren w zakresie 20-30 μm (RYS. 3a,b). Natomiast proszek Bond stanowią głównie ziarna nieprzekraczające 10 μm, oraz nieliczne duże ziarna o wielkości 40 μm (RYS. 3c.).

Analiza morfologii ziaren proszku Opaque Initial Ti wykazała zawartość głównie ziaren średnich od 10 μm do 35 μm (RYS. 4a). Dla proszku Opaqus Dentin (OD-A3) zaobserwowano ziarna duże o nieregularnych kształtach, a ich wielkość dochodzi nawet do 60 μm (RYS. 4b). Z kolei dla proszku Dentin (DA-3) (RYS. 4c) stwierdzono obecność ziaren o największym zróżnicowaniu wielkości od 1 μm – ziarna bardzo drobne, 10 μm – ziarna drobne, do 50 μm – ziarna grube.



RYS. 5. Widma EDS wraz z analizą z mikroobszaru dla proszków porcelany niskotopliwej Duceratin: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (D-A3), c) Bond.

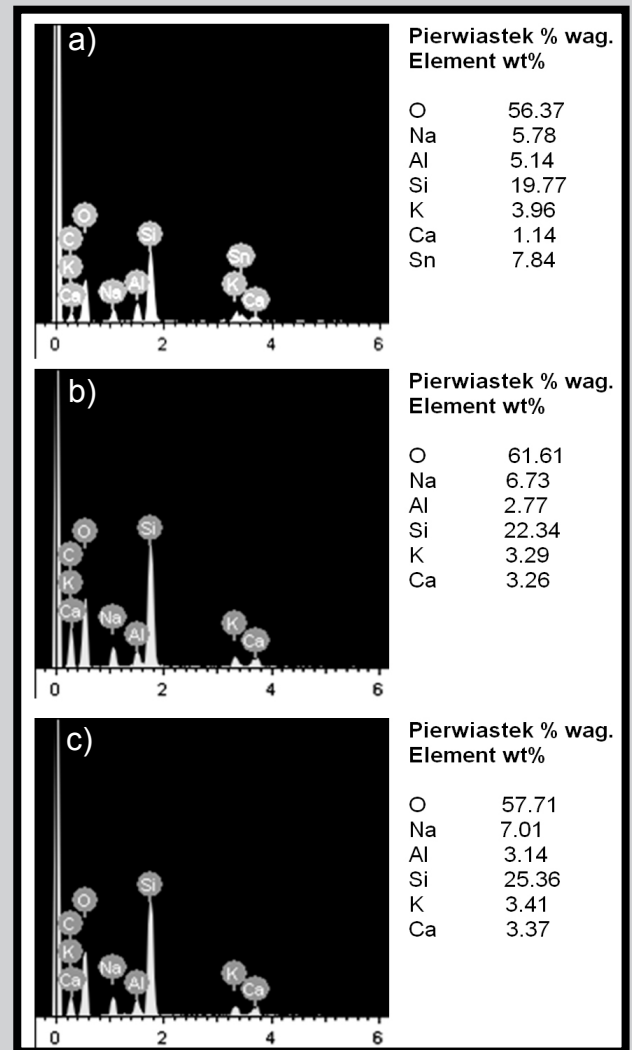
FIG. 5. EDS spectra and microanalyses of powders of low-melting porcelain Duceratin: a) Opaque (OA 3), b) Dentin (D-A3), c) Bond.

As for low-melting Ti/Entrance Kit (Initial Ti) porcelain by GC, X-ray analysis showed presence of amorphous phase in all the powders, similar as it was in the case of Duceratin (noticeable elevation of background in the range of 20 to 35 2θ). Presence of reflexes from crystalline phases was observed for Opaque Initial Ti powder. The phases included SnO₂, ZrO₂ and TiO₂.

The characteristic background elevation in the presence of amorphous phase for Opaque powder, both Initial Ti and by Duceratin is less noticeable than in other powders, which confirms higher contribution of crystalline phases.

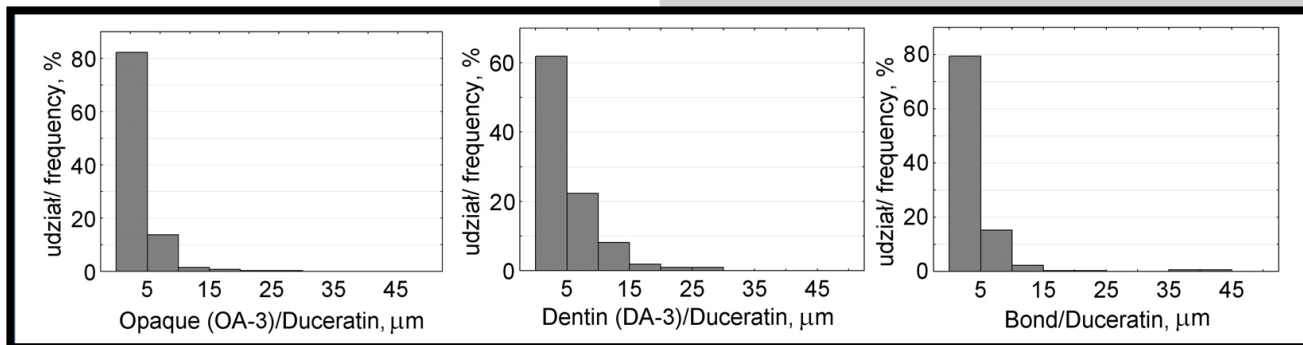
Analysis of morphology of the powders of low-melting porcelain Duceratin showed that the powders Opaque (OA 3) and Dentin (DA 3) contain high number of grains with size of 2 to 10 μm and 20 to 30 μm (FIG. 3a,b). Bond powder contains grains which do not exceed 10 μm and insignificantly huge grains with size ~ 40 μm (FIG. 3c).

Analysis of morphology for Opaque Initial Ti revealed the content of mainly middle-sized grains from 10 μm to 35 μm (FIG. 4a). Big grains with irregular shapes were observed for the powder Opaqus Dentin (OD-A3), with their size reaching even 60 μm (FIG. 4b). As for the powder Dentin (DA-3) (FIG. 4c), presence of grain with the highest difference from 1 μm (very fine grain), 10 μm (fine grain) to 50 μm (coarse grain) was found.



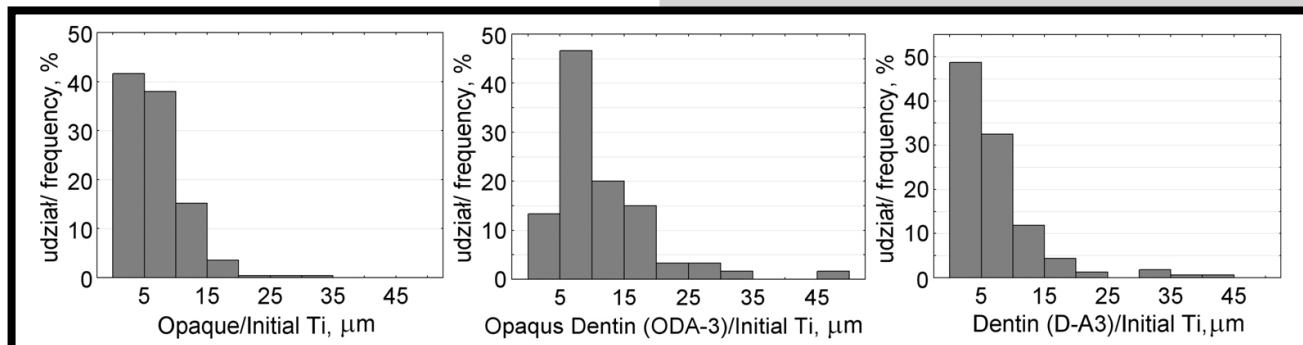
RYS. 6. Widma EDS wraz z analizą z mikroobszaru dla proszków porcelany niskotopliwej Initial Ti: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentin (D-A3).

FIG. 6. EDS spectra and microanalyses of powders of low-melting porcelain Initial Ti: a) Opaque, b) Opaqus Dentin (OD-A3), c) Dentin (D-A3).



RYS. 7. Histogramy średnicy ziaren proszków porcelany niskotopliwej Duceratin (Statistica 10).

FIG. 7. The particle diameter histogram of the powders Duceratin porcelain (Statistica 10).



RYS. 8. Histogramy średnicy ziaren proszków porcelany niskotopliwej Initial Ti (Statistica 10).

FIG. 8. The particle diameter histogram of the powders Initial Ti porcelain (Statistica 10).

TABELA 1. Wielkości ziaren proszków analizowanych porcelan (oprogramowanie Image Pro Plus3).

TABLE 1. The particle diameter of the porcelain powders calculated with Image Pro Plus3 software.

Wielkość cząstek Size of particle [μm]	Analizowane proszki / Powders analysis					
	Duceratin			Initial Ti		
	Opaque (OA-3)	Dentin (DA 3)	Bond	Opaque	Opaqus Dentin (OD-A3)	Dentin (D-A3)
Min.	0.50	1.07	1.04	1.01	3.37	1.56
Max.	28.69	28.96	41.17	30.59	51.98	43.57
Średnia / Mean	3.38	5.32	3.87	6.70	11.47	7.25
Odch. stand. / SD	2.97	4.38	4.81	4.42	8.28	6.60

Wykonane mikroanalizy dla badanych proszków wykazały podobny skład. Główny składnik stanowią: krzem, glin, sód, potas (RYS. 5). Dodatkowo we wszystkich proszkach porcelany Initial Ti stwierdzono obecność wapnia (RYS. 6). Dla proszków Opaque wyniki mikroanaliz potwierdziły zawartość tlenków zmętniających w postaci tlenku ceru dla porcelany Duceratin (RYS. 5a) i tlenku cyny dla porcelany Initial Ti (RYS. 6a).

Wyniki obserwacji skaningowych wykorzystano do określenia wielkości cząstek analizowanych proszków porcelany stosując komputerową analizę obrazu z oprogramowaniem Image Pro Plus3. Uzyskane wyniki przedstawiono na RYS. 7 i 8 oraz w TABELI 1.

Na podstawie uzyskanych wyników analizy obrazu skorelowano wyniki z danymi uzyskanymi na podstawie obserwacji mikroskopowych. Analiza porównawcza proszków porcelan niskotopliwych firmy: Duceratin i Initial Ti wykazała, że proszki Initial Ti charakteryzują się większymi rozmiarami cząstek, zarówno proszek Opaque jak również Dentin. Największy rozmiar cząstek określono dla proszku Opaque Dentin firmy Initial Ti – powyżej 50 μm, natomiast najdrobniejsze cząstki zawiera proszek Opaque Duceratin, określone na podstawie dwóch metod badawczych (SEM i analiza obrazu).

The chemical microanalyses for powders of both porcelains exhibited their similar composition. The main component is silicone, aluminum, sodium, potassium (FIG. 5). The powders of porcelain Initial Ti also showed presence of calcium (FIG. 6). Furthermore, Opaque powders revealed the content of opacifying oxides in the form of cerium oxide in Duceratin porcelain (FIG. 5a) and tin oxide in porcelain Initial Ti (FIG. 6a).

SEM observation results were used to determine particle size of porcelain powders analyzed using software Image Pro Plus3. The results are shown in FIGS 7, 8 and TABLE 1.

The results obtained from image analysis were correlated with the data obtained on the basis of microscopic observation. A comparative analysis of the low-melting porcelain powders: Duceratin and Initial Ti, showed that the Initial Ti powders have a larger particle size, both powders Opaque and Dentin. The largest particle size was determined for the powder Opaque Dentin of Initial Ti - greater than 50 microns, while the smallest particles of the powder contains Opaque Duceratin - determined on the basis of two methods (SEM and image analysis).

Przeprowadzona analiza fazowa wraz z oceną morfologii proszków pozwala na lepsze poznanie i zrozumienie zjawisk zachodzących podczas napalania porcelany na podłoża tytanowe. Uzyskane wyniki posłużą do opracowania techniki obróbki mechaniczno-chemicznej dla połączeń tytan-porcelana dentystyczna. Na podstawie danych literaturowych wiadomo bowiem, iż dodatek tlenków zmętniających (ceru, cyny) wpływa na właściwości mechaniczne porcelany. Autorzy pracy [10] wykazali, że wraz ze wzrostem zawartości SnO_2 wzrasta twardość porcelany, co wpływa na wytrzymałość połączenia tytan-porcelana. Z kolei w pracy autorstwa XingXing Li i inni [11] przedstawiono wpływ wielkości cząstek na barwę i walory estetyczne porcelany niskotopliwej. Naukowcy zbadali wpływ zawartości 15% tlenku cyny o różnych wielkościach cząstek w zakresie 0,85-21 μm . Wykazali, że wraz ze wzrostem zawartości oraz wzrostem wielkości ziaren uzyskuje się ciemniejsze i bardziej chromatyczne zabarwienie porcelany.

Podsumowanie

Analiza porównawcza stomatologicznej porcelany niskotopliwej różnych producentów wykazała, że skład podstawowych proszków bazuje na krzemianach i glinokrzmianach sodowo-potasowych niskim stopniu krystaliczności. Obecność faz krystalicznych stwierdzono tylko dla proszków Opaque zarówno w porcelanie Duceratin oraz Initial Ti. Dla porcelany Duceratin fazy krystaliczne występują głównie w postaci tlenku ceru, dla porcelany Initial jako tlenek cyny. Ponadto w obu proszkach, na podstawie analizy rentgenograficznej, stwierdzono obecność tlenków ZrO_2 i TiO_2 . Dodatek w/w tlenków pełniących rolę zmętniaczy wpływa korzystnie na pokrycie metalicznego podłoża (nieprzezierność warstw porcelany) [8,9].

Przeprowadzone badania morfologii oraz komputerowa analiza obrazu proszków wykazały duże zróżnicowanie wielkości ziaren w poszczególnych proszkach porcelanowych. Największe, pojedyncze ziarna > 50 μm zaobserwowano w proszku Opaqus Dentin (OD-A3) Initial Ti, a najmniejsze < 1 μm w proszku Opaque Duceratin.

Znajomość składu fazowego oraz pierwiastkowego porcelan niskotopliwych pozwala na wyjaśnienie zjawisk zachodzących podczas procesu wypalania podstawowych proszków porcelanowych na podłożach tytanowych w konstrukcjach do uzupełnień dentystycznych. Ponadto może przyczynić się do uzyskania lepszej jakości połączeń tytan-porcelana w zastosowaniach stomatologicznych.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach projektu N N507 472837, finansowanego przez NCN.

The phase analysis carried out in the study and knowledge about powder morphology gives an insight into the phenomena that occur during fusion of porcelain to titanium based material. The obtained results will be used to develop techniques for mechanical and chemical treatment titanium-dental porcelain bonding. The literature data show that addition of tin/cerium oxides has an effect on mechanical properties of porcelain. The author of the study [10] demonstrated that the increase in SnO_2 content improves hardness and affects strength of titanium-porcelain connection. Furthermore, the study by XingXing Li et al. [11] evaluated the effect of particle size on color and aesthetic values of low-melting porcelain. The researchers examined the effect of tin oxide (max. 15%) with different particle size within the range of 0.85-21 μm on porcelain properties. They demonstrated that the increase in the content and particle size leads to a darker and more chromatic porcelain color.

Conclusion

Comparative analysis of the dental low-melting porcelain from different manufacturers revealed that the basic composition of the powders is based on sodium-potassium silicates and aluminosilicates with considerably low degree of crystallinity. Presence of crystalline phases was found only for Opaque powder, both in Duceratin porcelain and in Initial Ti. They perform the role of opacifiers, such as cerium oxide in Duceratin porcelain and tin oxide in Ti/Entrance Kit by GC. Furthermore, both powders also contain ZrO_2 and TiO_2 . Addition of such oxides improves opacity of porcelain layers. They constitute a coating for the metallic background [8,9].

The examinations of powder morphology revealed high difference in grain size of individual porcelain powders. The biggest individual grains (> 50 μm) were observed in the powder Opaqus Dentin (OD-A3) Initial Ti, whereas the smallest grains (< 1 μm) were found in the powder Opaque Duceratin.

Knowledge of phase composition and elemental composition of low-melting porcelains allows for better explanation of the phenomena during the process of melting of basic powders on metallic base in frameworks for dental prostheses. This might also contribute to better understanding and improvement of the quality of titanium and porcelain connections used in dentistry.

Acknowledgements

This study was carried within the project N N507 472837, financed by NCS.

Piśmiennictwo

- [1] Majewski S.: Podstawy protetyki w praktyce lekarskiej i technice dentystycznej. Wydawnictwo stomatologiczne SZS. Kraków 2000.
- [2] Craig R., Powers J.: Materiały stomatologiczne. Wydawnictwo Medyczne Urban i Partner. Wrocław 2000.
- [3] Adamus J., Tubielewicz K.: Inżynieria Stomatologiczna Biomateriały. Tom 8. Nr 1. 2011.
- [4] Craig R.G., Powers J.M., Wataha J.C., pod red. Limanowskiej-Shaw H.: Materiały stomatologiczne. Wyd. Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2000.
- [5] Tsetsekou A., Papadopoulos T., Adamopoulos O.: Microstructure effect on the properties of a commercial low-fusing dental porcelain. J. Mat. Sci.: Mat. Med. 13, 4 (2002) 407-416.
- [6] Min Y., Chai-Tze K., Jyh-Siang Y., Tsui-Hsien H., Shinn-Jyh D.: Effect of preoxidation of titanium on the titanium-ceramic bonding. Surface & Coatings Technology 202 (2007) 288-293.

References

- [7] Wen-Fu H., Chung-Hsiao Ch., Wei-Kai Ch. et al: Evaluation of low-fusing porcelain bonded to dental cast Ti-Zr alloys. Journal of Alloys and Compounds 471 (2009) 185-189.
- [8] Nowoczesny Technik Dentystyczny 2/05, Wyd. Elmed 2005.
- [9] Matraszek H., Stoch A., Paluszkiewicz Cz., Adamczyk A., Trybulska B.: Badania porównawcze składu fazowego i chemicznego porcelan stomatologicznych: niskotopliwej Vita Titankeramik oraz wysokotopliwej Vita Keramik. Inżynieria Biomateriałów 45 (2005) 12-16.
- [10] Litong G., Yao Shi, Lizi G., Qian Z., Junlong T., Yabu Z., Tianwen G.: Preparation and characterization of titanium bonding porcelain. Materials Science and Engineering C 32 (2012) 1531-1535.
- [11] XingXing L., Zhang P., JianFeng Y., TianWen G.: Influence of particle size distribution of dental opacifier on the color of titanium opaque porcelain. Journal of Dentistry 395 (2011) e45-e50.

MATERIAŁY POLIMEROWE I WĘGLOWE W ASPEKTCIE ZASTOSOWANIA JAKO MATERIAŁ KONSTRUKCYJNY DYSKU POLSKIEJ MECHANICZNEJ ZASTAWKI SERCA - OCENA WYBRANYCH WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH

AGNIESZKA SZUBER^{1*}, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK¹, KAROLINA JANICZAK¹, MACIEJ GŁOWACKI¹, MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹, PIOTR WILCZEK¹, STANISŁAW DUBER², WITOLD KACZOROWSKI³, PIOTR NIEDZIELSKI³, JACEK GRABARCZYK³, WITOLD WALKE⁴

¹ FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, PRACOWNIA SZTUCZNEGO SERCA, UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE

² UNIWERSYTET ŚLĄSKI, WYDZIAŁ NAUK O ZIEMI, UL. BĘDZIŃSKA 60, 41-200 SOSNOWIEC

³ POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ

⁴ POLITECHNIKA ŚLĄSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, UL. GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72, 41-800 ZABRZE

* E-MAIL: ASZUBER@FRK.PL

Streszczenie

Badania biomateriałów polimerowych i węglowych prowadzone są w celu doboru odpowiednich materiałów konstrukcyjnych dla polskiej dyskowej mechanicznej zastawki serca typu Moll. W obszarze zainteresowania znalazły się: polieteroeteroketon (PEEK), PEEK utwardzony powierzchniowo warstwą węglową typu DLC oraz węgiel szklisty. Biomateriały zostały poddane wybranym badaniom strukturalnym (badaniom mikrotwardości metodą Vickersa i porowatości z wykorzystaniem analizatora Autosorb iQ) oraz badaniom własności mechanicznych na stanowisku badań zmęczeniowych. Własności biogodne biomateriałów oceniono wykorzystując nowoczesną metodę badań biologicznych biomateriałów - badania trombogenności powierzchni wykonano na urządzeniu Impact-R, w testach dynamicznego kontaktu z krwią w warunkach oddziaływania sił ścinających.

Wyniki badań zmęczeniowych i oceny trombogenności materiałów polimerowych potwierdziły właściwe zastosowanie materiału PEEK w konstrukcji dysku zastawki mechanicznej przeznaczonej do stosowania krótkoterminowego (około 12 miesięcy) w pozaustrojowej pulsacyjnej pompie mechanicznego wspomaganie serca. Zastosowanie utwardzającej powłoki węglowej typu DLC na polimerze stanowi właściwy kierunek prac mających na celu uzyskanie bardziej wytrzymałej powierzchni dysku w kontakcie z tytanowym pierścieniem zastawek, co potwierdziły testy zmęczeniowe. Przeprowadzone badania mikrotwardości biomateriałów wskazały wysoką wytrzymałość oraz twardość opracowywanego węgla szklistego.

Słowa kluczowe: dysk mechanicznej zastawki serca, biomateriały, biogodność, mechaniczne wspomaganie serca

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 25-32]

POLYMERIC AND CARBON MATERIALS APPLIED IN THE CONSTRUCTION OF POLISH MECHANICAL VALVE DISK – EVALUATION OF SELECTED PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES

AGNIESZKA SZUBER^{1*}, MAGDALENA KOŚCIELNIAK-ZIEMNIAK¹, KAROLINA JANICZAK¹, MACIEJ GŁOWACKI¹, MACIEJ GAWLIKOWSKI¹, ROMAN KUSTOSZ¹, MAŁGORZATA GONSIOR¹, PIOTR WILCZEK¹, STANISŁAW DUBER², WITOLD KACZOROWSKI³, PIOTR NIEDZIELSKI³, JACEK GRABARCZYK³, WITOLD WALKE⁴

¹ FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, WOLNOSCI 345A STR, 41-800 ZABRZE, POLAND

² UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF EARTH SCIENCE, BĘDZIŃSKA 60 STR, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

³ LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF MATERIALS ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/15 STR., 90-924 LODZ, POLAND

⁴ SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING, GEN. CHARLESA DE GAULLE'A 72 STR, 41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: ASZUBER@FRK.PL

Abstract

The polymeric and carbon biomaterials tests are performed in order to select the proper constructional materials for Polish mechanical tilting valve type Moll. In the area of interests are: polyetheretherketone (PEEK), PEEK with a DLC (diamond like carbon) surface layer and glassy carbon. The biomaterials were analyzed in selected structural tests (micro hardness tests utilizing Vickers method and porosity tests utilizing Autosorb iQ analyzer) and mechanical properties investigation on the fatigue test stand. Biocompatibility properties of biomaterials were evaluated utilizing new biological investigation method – biomaterial surface thrombogenicity test performed using Impact-R device, in the dynamic blood contact conditions with shear stress impact.

The results of fatigue and thrombogenicity tests of polymeric materials confirmed the proper PEEK use in the mechanical valve disk construction dedicated for short term application (approximately 12 months) in the extracorporeal pulsatile ventricular heart assists device. The hardened carbon type DLC surface layer on the polymer is the appropriate direction of investigation in order to obtain more durable disk surface in the contact with titanium valve housing, what was confirmed in fatigue tests. The micro hardness biomaterials tests showed high strength and hardness of investigated glassy carbon.

Keywords: mechanical heart valve disc, biomaterials, biocompatibility, mechanical heart support

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 25-32]

Niewydolność serca w ciągu ostatnich lat stanowi znaczący i rosnący problem współczesnej kardiologii. W grupie pacjentów ze skrajną niewydolnością serca (IV NYHA) transplantacja serca jest nadal „złotym standardem” w leczeniu. Ze względu na ograniczoną dostępność narządów możliwości medycyny transplantacyjnej są ograniczone. Sytuacja ta stymuluje rozwój nauki w kierunku alternatywnych metod leczenia jakim są między innymi mechaniczne protezy serca [1]. Trwające już ponad 20 lat prace w Pracowni Sztucznego Serca w Zabrze zaowocowały powstaniem pozaustrojowych pomp mechanicznego wspomaganie serca. Stosowana dotychczas w klinikach proteza POLVAD-MEV wyposażona jest w komercyjne jednodyskowe zastawki przeznaczone do stosowania w leczeniu wad zastawkowych. Mając na uwadze, iż dostępne na rynku zastawki dyskowe nie do końca sprawdzają się w konstrukcji pozaustrojowych pulsacyjnych pomp wspomaganie serca ze względu na duże elementy podtrzymujące dysk stojące w strudze przepływającej krwi, zwiększające ryzyko hemolizy i wykrzepiania, w ramach projektu „Polskie Sztuczne Serce” Instytut Maszyn Przepływowych Politechniki Łódzkiej opracował innowacyjną konstrukcję zastawek typu Moll. Nowa zastawka bazująca na projekcie prof. J. Molla (Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987) charakteryzuje się bardzo małymi i umiejscowionymi blisko pierścienia zastawki elementami podtrzymującymi dysk, dzięki czemu strumień krwi przepływający przez zastawkę nie jest zaburzany [2]. Zastawka typu Moll jest przeznaczona do stosowania w nowej pulsacyjnej pozaustrojowej pompie mechanicznego wspomaganie serca typu ReligaHeart EXT [3].

Z uwagi na ryzyko powikłań zatorowo zakrzepowych występujących podczas mechanicznego wspomaganie serca [4,5], niezwykle ważnym aspektem konstrukcyjnym zastawki jest dobór odpowiednich materiałów na pierścień i dysk zastawki. Podczas wieloletnich badań sprecyzowano wymagania, jakimi powinny charakteryzować się materiały stosowane w zastawkach mechanicznych: wywoływanie możliwie najmniejszych zaburzeń czynnościowych elementów morfotycznych krwi oraz tkanki śródbłonkowej otaczającej zastawkę, odporność na zużycie mechaniczne i strukturalne, minimalizowanie zjawiska odkładania się zakrzepów, nieuleganie degradacji w środowisku fizjologicznym, nieabsorbowanie składników krwi ani nieuwalnianie składników obcego pochodzenia do krwiobiegu, podatność na obróbkę technologiczną (szczególnie sterylizację za pomocą odpowiednich procesów), właściwe wykończenie powierzchni [4].

W latach 1987-1989 prowadzono badania pierwszego prototypu zastawki typu Moll, który składał się z pierścienia wykonanego ze stopu odlewniczego stellite i dysku wytworzonego z węgla pirolitycznego w procesie pirolizy na rdzeniu grafitowym. Ze względu na ówczesne ograniczenia technologiczne, badania prototypu wykazały niską wytrzymałość dysku na naprężenia zginające – warstwa węgla ulegała pękaniu. W kolejnym prototypie dysk zastawki wytworzono z poliacetalu (Delrin), jednak długoterminowe badania zmęczeniowe wykazały ograniczoną odporność dysku na cykliczne naprężenia ze strony elementów podtrzymujących dysk w pierścieniu – zaobserwowano wytarcia i wyszczerbienia dysku [2].

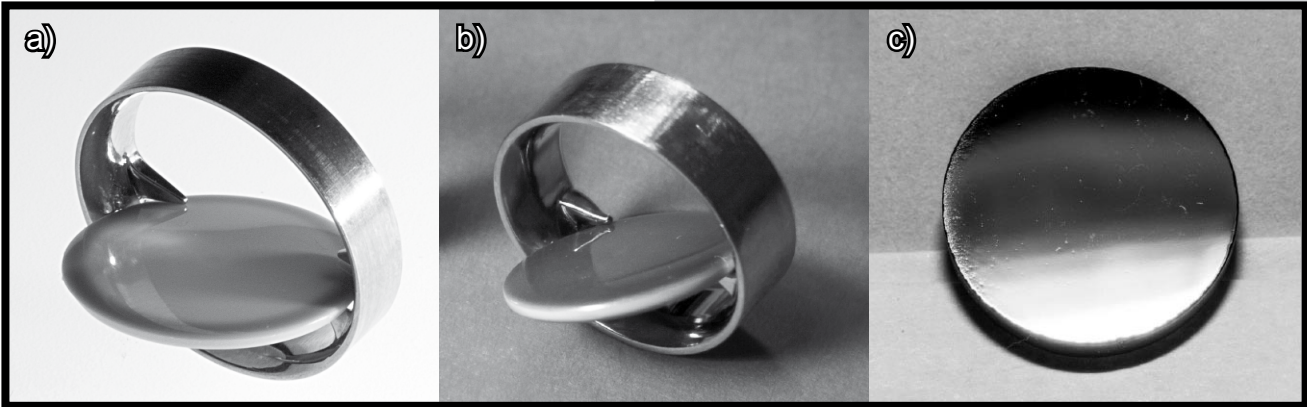
Bazę do wyboru właściwego materiału na dysk mechanicznej zastawki serca stanowił przegląd literaturowy dotyczący materiałów wykorzystywanych na pierścieniu i dyski mechanicznych zastawek serca stosowanych na świecie.

In recent years cardiac insufficiency is a significant and increasing problem of modern cardiology. The heart transplantation is still a “gold standard” in the treatment in a group of patients with end stage heart insufficiency (IV NYHA). Due to the limited availability of organs the capabilities of transplantation medicine are limited. The situation stimulates development of the alternative treatment methods, for example mechanical heart prostheses [1]. Lasting more than 20 years research works of the Artificial Heart Laboratory in Zabrze resulted in creation of an extracorporeal heart assist pump. The POLVAD MEV prosthesis is equipped with commercial mono disc valves designated to heart valve defect treatment. Taking into consideration that the mechanical valves available on the market are not the best option in the construction of extracorporeal pulsatile ventricular assist devices because of the big upholding disc elements crossing the blood stream, increasing the hemolysis and thrombus risk, within the “Polish Artificial Heart” project, the Institute of Turbo Machinery at the University of Technology in Lodz developed an innovative Moll valve construction. The new valve, based on the professor J. Moll project (Moll J.J. patent USA 4.661.106, 1987; Moll J.J. patent USA 4.725.275, 1987), is characterized by small and located close to the valve housing upholding disc elements, therefore the blood stream flowing through the valve is not disturbed [2]. The Moll valve is dedicated to the construction of a new pulsatile extracorporeal ventricular assist device ReligaHeart EXT [3].

Due to embolism and thrombus complications during mechanical heart support [4,5], extremely important constructional valve aspect is to select proper materials for valve housing and disc valve. During many years of research the mechanical heart valve prosthesis materials requirements were specified: causing minimal functional disorders of blood cell and endothelial tissue surrounding the valve, having mechanical and structural wear resistance, minimizing blood clots deposition, not degrading in the physiological environment, not absorbing blood components and not releasing foreign components to the blood stream, being suitable for technological processing (especially for sterilization using appropriate process), having appropriate surface modification [4].

In 1987-1989 the first prototype of Moll valve examinations were performed. The prototype consisted of Stellite (casting alloy) ring and pyrolytic carbon disc developed in the pyrolysis process on the graphite cord. Due to technological limitations in those days, the prototype investigation shown low disc resistance on the bend stress – the layer was broken. In the next prototype the valve disc was manufactured from polyacetal (Delrin), but long term fatigue tests showed limited disc resistance in the cycling stress of upholding disc elements – the disc damages were observed [2].

The literature review of valve housings and discs material construction applied worldwide was the basis of the appropriate biomaterial selection. Currently the predominant material for valve housing is titanium (Medtronic Hall, Sorin, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor Heart Valve, Wada-Cutter, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool), and for the valve disc is Delrin (Björk-Shiley Delrin, Kay-Shiley), Teflon (Wada-Cutter), polyethylen (Chitra heart valve) and pyrolytic carbon (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omnicarbon TM, Björk-Shiley Aortic Standard, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor Heart Valve, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool) [6-8].



RYS. 1. a) Zastawka typu Moll z dyskiem z PEEK; b) zastawka typu Moll z dyskiem z PEEK pokrytym warstwą DLC; c) węgiel szklisty.

FIG. 1. a) Moll valve with PEEK disc; b) Moll valve with PEEK+DLC disc; c) glassy carbon.

Materiałem dominującym na pierścieniach zastawek aktualnie jest tytan (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor, Wada-Cutter, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool), a na dysk wykorzystywano Derlin (Björk-Shiley Delrin, Kay-Shiley), teflon (Wada-Cutter), polietylen (Chitra) i najbardziej rozpowszechniony - węgiel pirolityczny (Medtronic Hall, Sorin Carbocast, Omnicarbon, Björk-Shiley, Omniscience, Lillehei-Kaster, Ultracor, Cooley-Cutter, Beall-Surgitool) [6-8].

W niniejszej pracy badaniom poddano trzy materiały opracowywane do potencjalnego zastosowania na dyski polskich mechanicznych zastawek serca: polieteroeteroketon (PEEK), PEEK utwardzony powierzchniowo warstwą węglową typu DLC (DLC - diamond like carbon) i węgiel szklisty. Prototypy zastawek z dyskiem z polieteroeteroketonu (PEEK) opracowano w ramach programu „Polskie Sztuczne Serce” - RYS. 1a. Z uwagi na fakt, iż dyski polimerowe cechują się słabą odpornością na ścieranie [4] w kontakcie z tytanowym pierścieniem, co stanowi istotną przeszkodę do zastosowania takiej zastawki w leczeniu długoterminowym, dla zwiększenia wytrzymałości powierzchni polimerowego dysku zastawki podjęto próby wytworzenia atrombogenicznej warstwy powierzchniowej zwiększającej jego odporność na ścieranie. W ramach projektu rozwojowego pt. „Opracowanie typoszeregu dyskowych zastawek mechanicznych dla pediatrycznych komór wspomaganie serca”, opracowano metodę wytwarzania na powierzchni dysków z PEEKu warstwy węgla diamentopodobnego (DLC - diamond like carbon) - RYS. 1b. Równolegle prowadzone są prace nad wytworzeniem dysku z węgla szklistego w ramach projektu badawczego „Węglowy dysk dla zastawki mechanicznej dla polskich komór wspomaganie serca”, w którym opracowano metodę wytwarzania dysku o wysokiej twardości i niskiej porowatości z węgla szklistego (RYS. 1c).

Z uwagi na fakt, iż biochemiczna degradacja i mechaniczne zużycie są największymi problemami biomateriałów konstrukcyjnych mechanicznych zastawek serca, a nawet najmniejsze uszkodzenia powierzchni zastawki sprzyjają formowaniu się skrzepin [4], prace badawcze rozpoczęto od wykonania badań własności mechanicznych i strukturalnych oraz dokonania analizy potencjału trombotycznego powierzchni wybranych rozwiązań materiałowych.

In this paper, three materials have been studied which were developed for the potential use in a Polish mechanical heart valve discs: polyetheretherketone (PEEK), PEEK with a hardened carbon type DLC (diamond like carbon) surface layer and glassy carbon. The valves prototypes with polyetheretherketone (PEEK) disc were developed within the “Polish Artificial Heart” project – FIG. 1a. Because of the fact, that polymeric discs are characterized by low wear resistance [4] in the contact with titanium housing which is a significant obstacle to use such valve in long term treatment, to increase the polymeric disc surface resistance the atrombogenic surface layer was developed to improve the disc wear resistance. Within the project “Development of mechanical valve series for pediatric ventricular assist device” the diamond-like carbon layer (DLC) on PEEK discs surface was developed - FIG. 1b. Simultaneously the research to obtain a glassy carbon disc was carried on as a part of the research project: “Mechanical valve carbon disc for Polish ventricular assist device” in which production method was developed to obtain the glass carbon valve disc characterized by high hardness and low porosity (FIG. 1c).

Due to the fact, the biochemical degradation and mechanical wear are the biggest problems of mechanical valves constructional biomaterials and even the smallest valve surface damage cause cloths formation [4], the research works began from mechanical and structural properties tests and evaluation of selected biomaterials surface thrombogenicity.

Materials and methods

Tested materials

1. PEEK Optima LT1® Invibio (analysis DSC (20°C/min.), $T_c = 146^\circ\text{C}$, $T_m = 292^\circ\text{C}$, $T_M = 341^\circ\text{C}$; density 1,31 g/cc) – biocompatible polymer available to use in long term implants (more than 30 days) [9];

2. PEEK Optima LT1® Invibio [9] with DLC layer developed utilizing the chemical vapor deposition in the plasma method, microwave and radiofrequency assisted (MW/RF-PACVD) [10];

3. Glassy carbon developed in 2 stages, in the first stage, a mixture of furfural alcohol and catalyst, a solution of 4-toluensulfonic acid in ethanol are subjected to polymerization in an aluminum mold at temperature of 130°C. So prepared solid material is removed from the mold and is subjected to mechanical machining to achieve a proper shape including contraction of this material occurring in the second stage of the preparation of glassy carbon – carbonization in an argon atmosphere up to 1000°C.

Badane materiały

1. PEEK Optima® Invibio (analiza DSC (20°C/min.), $T_g = 146^\circ\text{C}$, $T_c = 292^\circ\text{C}$, $T_m = 341^\circ\text{C}$; gęstość 1,31 g/cc) - biogodny polimer przeznaczony do stosowania na implanty długoterminowe (powyżej 30 dni) [9];

2. PEEK Optima® Invibio [9] z warstwą węgla diamentopodobnego (DLC) wytworzoną za pomocą metody chemicznego osadzania z fazy gazowej w obszarze plazmy wspomaganej częstotliwością mikrofalową i radiową (MW/RFPACVD) [10];

3. Węgiel szklisty wytwarzany dwuetapowo, w pierwszym etapie mieszanina alkoholu furfurylowego z katalizatorem w postaci roztworu kwasu 4-tolueno-sulfonowego w etanolu poddawana jest polimeryzacji w aluminiowych formach w temperaturze do 130°C, następnie lity materiał usuwany jest z form i poddawany obróbce mechanicznej dożądanego kształtu z uwzględnieniem skurczliwości występującej w wyniku drugiego etapu wytwarzania węgla szklanego - karbonizacji w atmosferze argonu do 1000°C.

Badania wybranych własności strukturalnych biomateriałów

Badania mikrotwardości metodą Vickersa zostały wykonane z wykorzystaniem mikrotwardościomierza DuraScan 50 firmy Struers. Pomiar przeprowadzono przy obciążeniu $HV_{0,01}$ (10 G) zarówno dla próbek polimerowych, jak i dla próbek z materiału węglowego. Wykonano po 10 pomiarów na zglądach wzdluznych i poprzecznych.

Próbki z materiału węglowego poddano badaniom porowatości. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem analizatora Autosorb iQ firmy Quantachrome wraz z oprogramowaniem ASiQwin. Analizator posłużył do pomiaru adsorpcji i desorpcji na powierzchni ciała stałego z zastosowaniem określonej prędkości pary nasyconej i statycznej próby objętościowej. W przeprowadzonym badaniu jako adsorbant został użyty azot. Materiał przed badaniem wstępnie osuszono, rozkruszono i umieszczono w naczyniu pomiarowym. W pierwszej kolejności odgazowano próbki w temperaturze $T = 200^\circ\text{C}$, a następnie wyznaczono pełną izotermę adsorpcji w temperaturze ciekłego azotu ($T = -197^\circ\text{C}$). Na podstawie uzyskanych izoterm obliczono powierzchnię właściwą próbek metodą BET (Brunauer, Emmett, Teller) oraz wyznaczono rozkład porów metodą BJH (Barrett, Joyner, Halenda).

Badania wybranych własności mechanicznych biomateriałów

Dyski zastawek wykonane z PEEKu oraz PEEKu z warstwą węglową typu DLC poddano testom zmęczeniowym na stanowisku laboratoryjnym. Dynamiczny test zmęczeniowy polegał na ciągłej, cyklicznej pracy zastawki z zamontowanym dyskiem, wymuszonej przez strumień cieczy, o kontrolowanej amplitudzie ciśnienia oddziaływującej na dysk zastawki. Fala ciśnienia w części hydraulicznej generowana była przez system pneumatyczny, w którym zastosowany został elektrozawór, sprzężony membraną z częścią hydrauliczną. Cały układ badawczy zarządzany był przez dedykowany system kontrolno-pomiarowy zbudowany na bazie wielofunkcyjnych kart pomiarowych, komputera PC oraz oprogramowania sterującego - pomiarowego napisanego w środowisku LabVIEW.

Structural properties of biomaterials

The micro hardness examination by the Vickers method with the utilization of a micro hardness analyzer DuraScan 50 (Struers) was done. The measurements were performed at the load of $HV_{0,01}$ (10 G) for polymer and carbon material. Ten measurements were performed on longitudinal and transverse micro sections.

Porosity examination was conducted for the carbon samples. The test was performed with the utilization of Autosorb iQ (Quantachrome) analyzer with ASiQwin program. The analyzer was used for adsorption and desorption analysis on solid surfaces with the utilization of a specific resilience of saturated steam and static volume test. In this examination nitrogen was used as an adsorbent. The material before examination was dried, crushed and placed in a measuring vessel. First, the samples were degassed at 200°C, and afterwards, full adsorption isotherm at liquid nitrogen temperature (-197°C) was set. On the basis of the obtained isotherm the specific surface area was calculated by the BET (Brunauer, Emmett, Teller) method and the pore distribution by BJH (Barrett, Joyner, Halenda) method.

Mechanical properties of biomaterials

Fatigue tests of PEEK and PEEK with carbon layer DLC discs were done on a special laboratory stand. The dynamic fatigue test consisted in permanent, cyclic valve work, generated by fluid flow controlled by pressure amplitude interacting with the valve disc. Pressure wave in the hydraulic part is generated by a pneumatic system in which an electro valve was coupled with a membrane in the hydraulic part. The whole laboratory stand was managed by a dedicated measurement and control system on the basis of multifunctional data acquisition cards, computer, control and measurement software written in the Lab View. The following parameters during the fatigue test were applied: valve closing pressure difference: fixed at 10 kPa (pressure difference measured before and behind the valve during normal work in a ventricular assist device is up to 7 kPa), valve operating frequency: 8 Hz - 480 beat per minute (typical frequency of valve work in a ventricular assist device is 1.3 Hz (80 bpm), temperature of the hydraulic fluid: $37 \pm 2^\circ\text{C}$, duration of the experiment - 60 days (equivalent of one year work simulation).

Thrombogenicity of biomaterials

All mentioned above materials underwent the surface thrombogenicity assessment with the utilization of Impact R test [11-13]. Biomaterial samples were prepared in accordance with the requirements of the Impact R test method, in the form of 14.4 mm diameter discs. Before examination, the samples were sterilized with ethylene oxide. The test was performed in dynamic conditions where blood flow above the investigated surface with a determined speed and in defined period of time. The test conditions simulated physiological blood flow at the wall of medium-sized arteries. Polystyrene was the reference material, recommended by device producer as simulating the surface with the most similar conditions to arterial vessels wall area. After the experiment, selected parameters were determined:

- activation of selected cell receptors in the blood cells after contact with biomaterials surface - in examinations utilizing flow cytometry (Beckman Coulter),
- number of adhered blood cells with active receptors on the biomaterials surface after blood contact - in examinations utilizing fluorescence microscopy (Carl Zeiss).

Podczas badań zmęczeniowych zastosowano następujące parametry testu: różnica ciśnień domykająca dysk zastawki na stanowisku zmęczeniowym: do 10 kPa (różnica ciśnień przed i za zastawką w trakcie normalnej pracy zastawki w komorze wynosi do 7 kPa), częstotliwość pracy zastawki na stanowisku zmęczeniowym: 8 Hz - 480 uderzeń na minutę (typowa częstotliwość zastawki w trakcie normalnej pracy w komorze wynosi 1,3 Hz - 80 uderzeń na minutę), temperatura cieczy hydraulicznej: $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, czas trwania eksperymentu - 120 dni (symulacja dwóch lat pracy zastawki).

Badania trombogenności powierzchni biomateriałów

Wszystkie biomateriały poddano ocenie trombogenności powierzchni z wykorzystaniem testu IMPACT-R [11-13]. Próbkę biomateriałów do badań przygotowano zgodnie z określonymi wymogami zastosowanej techniki badawczej IMPACT-R, materiały badano w postaci krążków o średnicy 14,4 mm. Próbkę przed eksperymentem poddano procesowi sterylizacji tlenkiem etylenu. Testy prowadzono w warunkach dynamicznych wprowadzając krew w ruch wirowy z określoną prędkością obrotową nad powierzchnią próbek badanych (w określonym czasie). Warunki eksperymentu modelują warunki fizjologiczne przepływu krwi przy ścianie średnich naczyń tętniczych. Materiałem referencyjnym był polistyren, materiał wskazany przez producenta urządzenia pomiarowego jako symulujący powierzchnię o warunkach najbardziej zbliżonych do fizjologicznych w pobliżu ściany naczynia tętniczego. Po przeprowadzeniu doświadczenia oceniano:

- aktywność wybranych receptorów komórkowych we krwi po kontakcie z powierzchnią biomateriałów - w badaniu z zastosowaniem cytometrii przepływowej (Beckman Coulter),
- liczbę zaadherowanych komórek krwi z aktywnymi receptorami na powierzchni biomateriałów po kontakcie z krwią - w badaniu z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego (Carl Zeiss).

Wyniki i dyskusja

Badania mikrotwardości i zmęczeniowe materiałów polimerowych

Badania mikrotwardości próbek polimerowych wykazały, iż twardość czystego PEEKu kształtowała się na poziomie $27\text{ HV}_{0,01}$, a dla próbek z naniesioną warstwą DLC wynosiła $35\text{ HV}_{0,01}$. Ze względu na małą liczebność próbek i nieznaną charakter rozkładu zmiennej losowej zastosowano nieparametryczny test rangowanych sum Wilcozona. Wynik statystyki testowej $p = 0,00655$ jest mniejszy od przyjętego poziomu istotności $p = 0,05$, a zatem miary skupienia zmiennej losowej w badanych grupach nie są równe.

Dyski zastawek z PEEKu niemodyfikowanego powierzchniowo i z warstwą węglową typu DLC poddano testom zmęczeniowym na stanowisku laboratoryjnym. Dyski z powłokami diamentopodobnymi charakteryzowały się większą odpornością na ścieranie niż dyski wykonane z niemodyfikowanego materiału PEEK. Po 120 dniach testu zmęczeniowego, odpowiadającego dwóm latom pracy zastawek w typowych warunkach i z typową częstotliwością pracy w protezie serca, zastawki poddano oględzinom makro- i mikroskopowym. Na dysku zastawki z warstwą DLC zaobserwowano delikatne wytarcia w postaci bieżni spowodowane kontaktem z trójkątnymi „kolcami” pierścienia (RYS. 2b) - obserwowana bieżnia jest jednak mniejsza niż w przypadku dysku z niemodyfikowanego PEEKu (RYS. 2a).

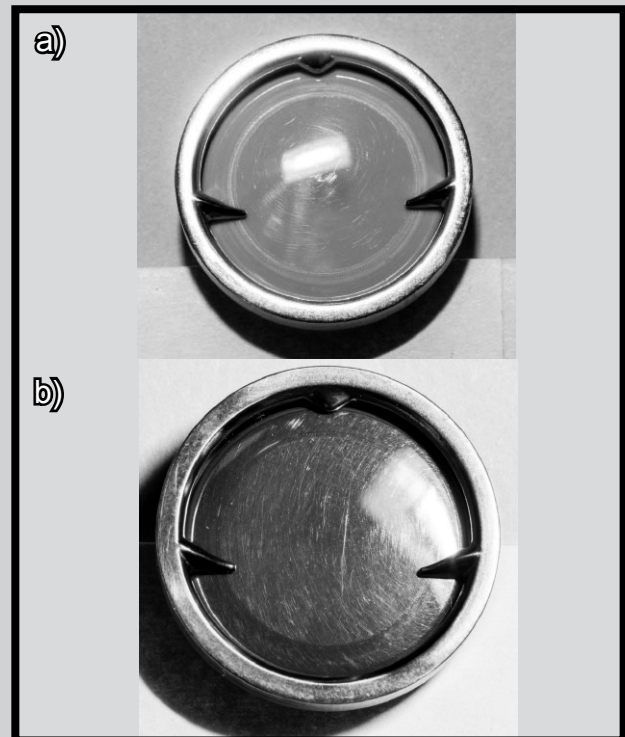
Results and Discussion

Micro hardness and fatigue tests of polymeric materials

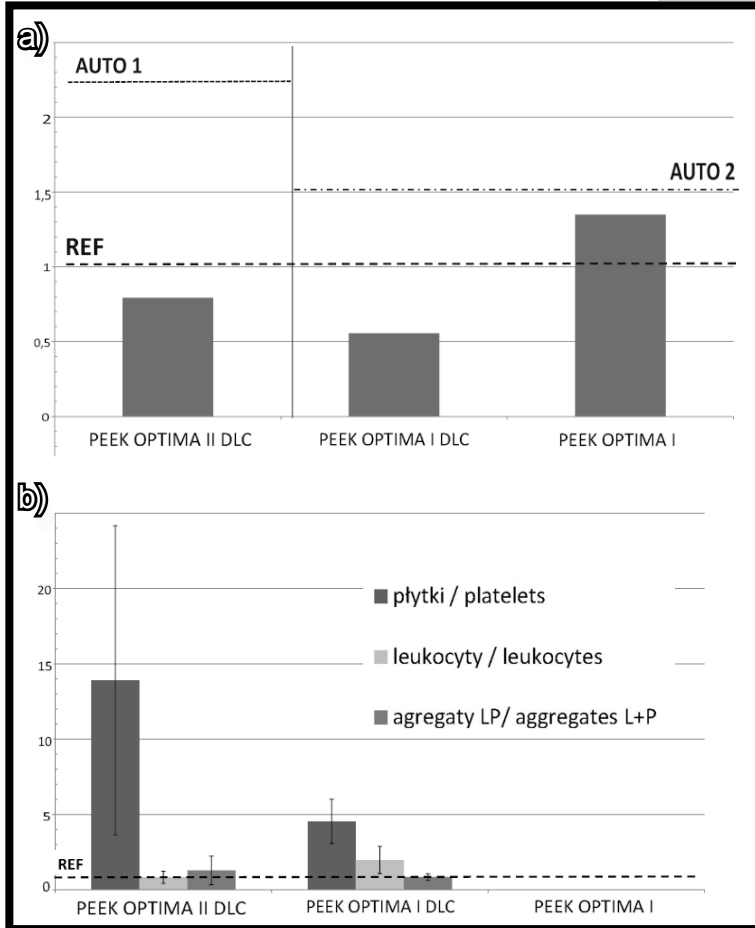
The micro hardness examinations of polymer samples revealed that unmodified PEEK hardness reached the level of $27\text{ HV}_{0,01}$, and samples with a DLC layer hardness values were higher and reached the level of $35\text{ HV}_{0,01}$. Due to the low number of the samples and the unknown nature of the random variable a nonparametric Wilcoxon test was applied. Statistic test result $p = 0.00655$ is less than the assumed statistical significance, and thus concentration degree of a random variable in the study groups are not equal.

Valve discs made of unmodified PEEK hardness reached the level of $27\text{ HV}_{0,01}$, and samples with a DLC layer hardness values were higher and reached the level of $35\text{ HV}_{0,01}$. Due to the low number of the samples and the unknown nature of the random variable a nonparametric Wilcoxon test was applied. Statistic test result $p = 0.00655$ is less than the assumed statistical significance, and thus concentration degree of a random variable in the study groups are not equal.

Unmodified PEEK and PEEK with a DLC layer underwent fatigue tests in a special laboratory stand. Discs with DLC layers were characterized by higher wear resistance than PEEK discs. After 120 days of fatigue tests - which correspond to two years of typical working conditions and with a typical work frequency in a heart assist device - the valves were inspected by macro- and microscopic observations. On the valve disc with DLC, gentle abrasions in the form of a treadmill were observed, caused by the contact with triangular valve housing „spikes” (FIG. 2b). However, the identified treadmill was relatively smaller than the treadmill obtained in valve discs made from unmodified polyetheretherketone (FIG. 2a).



RYS. 2. Zastawki mechaniczne typu Moll po przeprowadzeniu ponad 100 dniowego testu zmęczeniowego: a) dysk z niemodyfikowanego PEEKu, b) dysk z PEEKu pokrytego warstwą DLC. FIG. 2. Moll valves after 120 days fatigue test: a) PEEK disc, b) PEEK disc with DLC layer.



RYS. 3. Znormalizowane wyniki dla:
 a) % aktywności badanych agregatów leukocytno-płytkowych we krwi po kontakcie z powierzchnią badanych polimerowych materiałów, n=6;

b) liczby zaadherowanych elementów komórkowych na powierzchni badanych materiałów po testach Impact-R, dla trzech serii badań: PEEK Optima I DLC - Polimer PEEK Optima z wytworzoną węglową warstwą typu DLC, próbki zostały wytworzone na wstępnie (częściowo) wypolerowanej formie wtryskowej; PEEK Optima II DLC - Polimer PEEK Optima z wytworzoną węglową warstwą typu DLC, próbki zostały wytworzone na dokładnie wypolerowanej formie wtryskowej.

FIG. 3. Normalized results for:

a) % activation of platelet-leukocyte aggregates in the blood after contact with polymeric materials surface, n=6;

b) number of adhered cell elements on the polymeric materials surface after Impact-R tests, for three test series: PEEK Optima I DLC - PEEK Optima polymer with a carbon DLC layer, samples were produced utilizing a not precisely polished injection mold; PEEK Optima II DLC - PEEK Optima polymer with a carbon DLC layer, samples were produced utilizing a precisely polished injection mold.

Badania trombogenności materiałów polimerowych

Eksperyment został przeprowadzony na pełnowartościowej krwi w czasie zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie płytek krwi. Wartości morfologiczne, parametry aktywacji układu płytkowego i leukocytnego krwi pobranej do badań były prawidłowe. We krwi nie stwierdzono obecności niesteroidowych leków przeciwzapalnych, co potwierdziło badanie agregacji płytek krwi w teście kwasu acetylosalicylowego ASPi na agregometrze impedancyjnym. Analiza statystyczna testem U Manna-Whitneya na poziomie istotności $p = 0,05$ wykazała, że dla aktywacji krwi wolnostojącej przed i po eksperymencie wartości były zbliżone, co oznacza, iż nie zdefiniowano znamiennej istotnych statystycznie różnic w autoaktywacji krwi.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż obie badane powierzchnie polimerowe wykazały poziom aktywacji dla agregatów leukocytno-płytkowych poniżej poziomu autoaktywacji krwi (RYS. 3a). Jednak poziom aktywacji agregatów leukocytno-płytkowych dla PEEK był wyższy niż dla aktywacji krwi przez materiał referencyjny. W badaniach zaobserwowano, iż powłoki węglowe wytworzone na polimerze działają ochronnie, nie generując zwiększonej aktywacji krwi.

PEEK z warstwą węglową typu DLC cechował się adhezyjnością powyżej poziomu referencyjnego (RYS. 3b). Materiałem o najniższym potencjale trombogenicznym był niemodyfikowany polimer PEEK, dla którego nie zaobserwowano adhezji żadnych badanych elementów morfotycznych krwi.

W celu potwierdzenia dobrych własności atrombogenicznych badanych materiałów i w związku z tym możliwości ich zastosowania w elementach konstrukcyjnych protez zastawek serca, należy wykonać badania in vitro na krwi gotowych wyrobów medycznych, tj. prototypów protez zastawek serca wyposażonych w dyski wykonane z niemodyfikowanego PEEKu oraz PEEKu z warstwą DLC.

Thrombogenicity tests of polymeric materials

The examination was performed with a blood of standard value during the time ensuring proper platelets function. Morphology parameters, platelet and leukocytes systems activation properties of blood samples were correct. There was no non steroid anti-inflammatory drugs found in the blood, what was confirmed by blood platelets aggregation ASPi test utilizing an impedance aggregator. A statistical analysis with the utilization of a U Manna-Whitney test of a significance level of $p = 0.05$ revealed, that static sample blood activation values before and after the experiment were similar, which means, that there were no statistically significant differences in blood auto activation.

It was found that both polymer surfaces revealed the platelet-leukocyte aggregates activation level below the blood auto activation level (FIG. 3a). However, the platelet-leukocyte aggregates activation level of PEEK was higher than the blood activation level of reference material. It was observed that the carbon layer had a protective effect on the polymer surface without increasing the blood activation level.

PEEK with DLC layer was characterized by cell adhesion over the level of reference material (FIG. 3b). The material with the lowest thrombogenic potential was pure PEEK, for which no adhesion of blood components was observed.

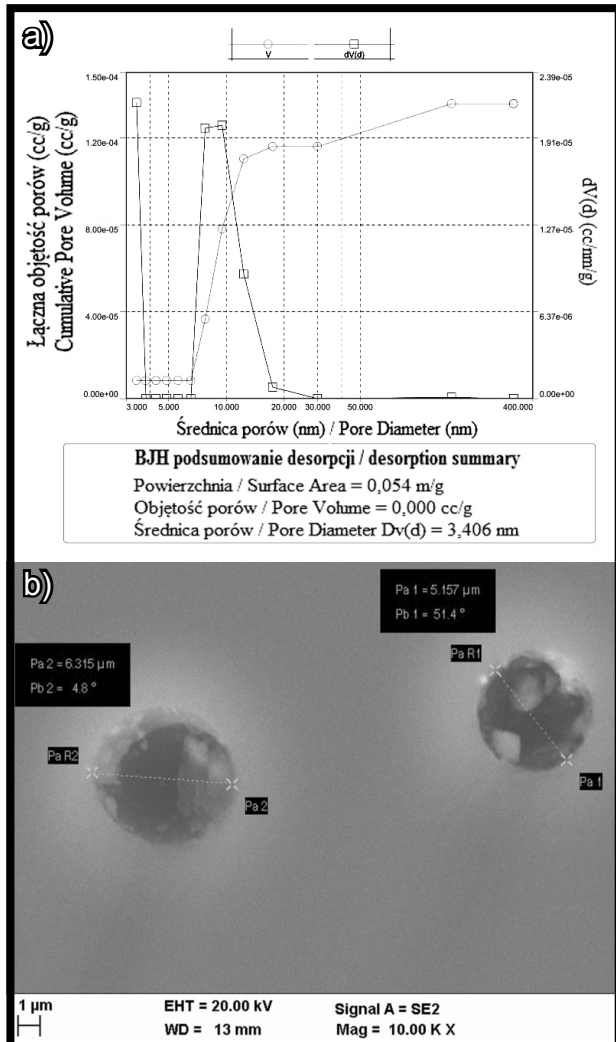
To confirm good thrombogenicity properties of tested biomaterials and its application possibilities in heart valves prostheses, additional in vitro blood tests should be performed of final medical devices, i.e. heart valves prototypes equipped with discs made from unmodified PEEK and PEEK with DLC layer.

Badania mikrotwardości i porowatości dla materiału węglowego

Wykonane badania potwierdziły, że opracowana metoda wytwarzania dysku z węgla szklistego pozwala na uzyskanie węglowego materiału mezoporowatego o czystości 99%, średnicy porów od 3 do 30 nm i wysokiej twardości rzędu 1434 HV_{0,01}. Zaobserwowano pojedyncze defekty w strukturze biomateriału w postaci porów wielkości około 6 μm (RYS. 4), których obecność mogła być wynikiem trudności technologicznych w fazie polimeryzacji alkoholu furfurylowego z katalizatorem. W ramach kontynuacji badań planowane jest wyeliminowanie niejednorodności poprzez prowadzenie procesu polimeryzacji w środowisku gazu obojętnego (argonu).

Badania trombogenności materiału węglowego

Poziom aktywacji receptorów leukocytno-płytkowych krwi po kontakcie z węglem szklistym był na porównywalnym poziomie jak poziom aktywacji receptorów po kontakcie z powierzchnią polistyrenową (RYS. 5a). Poziom adhezji agregatów leukocytno-płytkowych do powierzchni węgla szklistego był zbliżony do adhezji agregatów do materiału referencyjnego (RYS. 5b).



RYS. 4. a) krzywa BJH uzyskana dla próbki węgla szklistego; b) defekty w postaci pojedynczych porów.

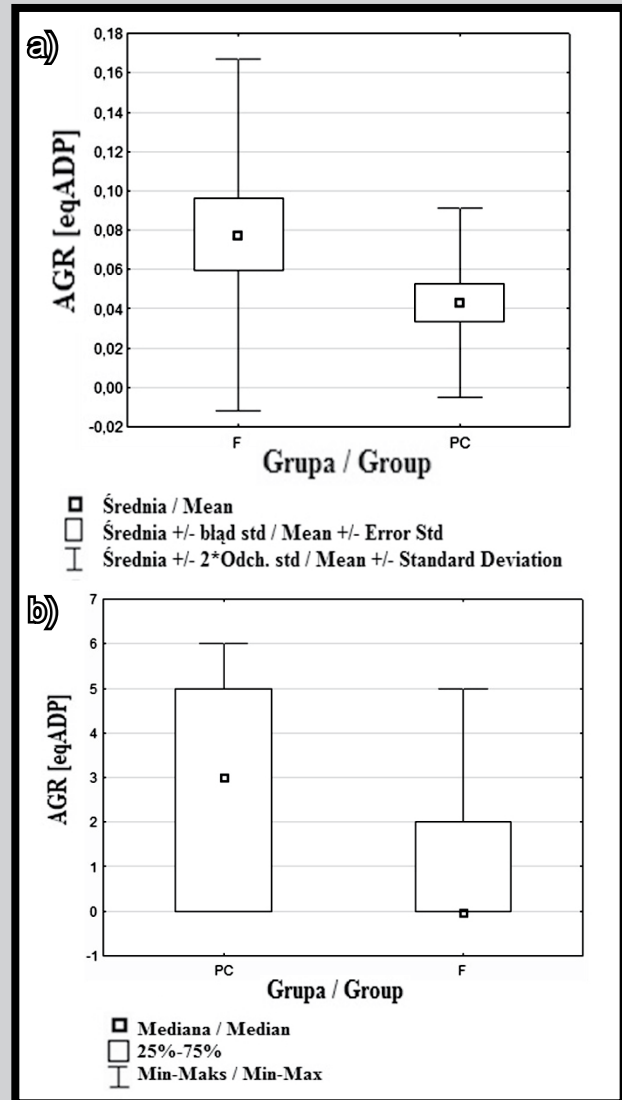
FIG. 4. a) BJH line obtained for glassy carbon sample; b) single pores defects.

Microhardness and porosity tests – carbon material

The investigations confirmed that the developed carbon material production process allow to obtain a mesoporus carbon material with 99% purity, pore diameter from 3.4 to 30 nm and high hardness about 1434 HV_{0,03}. Single defects in form of pores in size of approximately 6 μm were observed (FIG. 4), which could be the result of technical difficulties in the polymerization of furfural alcohol with the catalyst. It is planned to continue the research work on the carbon production method by carrying out the polymerization in an inert gas environment (argon).

Thrombogenicity tests – carbon material

The activation level of platelet-leukocytes receptors in the blood after contact with glassy carbon was on a comparable level to the activation of platelet-leukocytes in the blood after contact with polystyrene surface (FIG. 5a). The adhesion level of platelet-leukocytes aggregates for glassy carbon surface was similar to the results obtained for the reference material (FIG. 5b).



RYS. 5. Graficzne przedstawienie analizy statystycznej testem U Manna-Whitneya wyników: A - % aktywacji, B - adhezji agregatów leukocytno-płytkowych dla F (węgiel szklisty) próbek badanych i materiału referencyjnego PC (polistyren), n = 6. FIG. 5. Statistical analysis of U Mann-Whitney test results: A - % of activation, B - adhesion of platelet-leukocytes aggregates for F (glassy carbon) samples and reference material PC (polystyrene), n = 6.

Wyniki badań zmęczeniowych i ocena trombogenności materiałów polimerowych potwierdzają poprawne zastosowanie polimeru PEEK jako materiału na dysk zastawki mechanicznej przeznaczonej do stosowania krótkoterminowego (około 12 miesięcy) w pozaustrojowej pulsacyjnej pompie mechanicznego wspomaganie serca. Zastosowanie utwardzającej powłoki węglowej typu DLC na polimerze jest właściwym kierunkiem uzyskania bardziej wytrzymałej powierzchni dysku w kontakcie z tytanowym pierścieniem zastawki, co potwierdzają wyniki testów zmęczeniowych zastawek. Bazując na przeglądzie literaturowym słusznym jest także opracowywanie dysku wykonanego z materiału węglowego i odpornego na zużycie podczas długoterminowej pracy zastawki [4-8, 14, 15]. Przeprowadzone badania mikro-twardości biomateriałów potwierdziły wysoką twardość węgla szklanego, przeznaczonego do długoterminowego stosowania w zastawkach typu Moll. W dalszych etapach prac należy jednak przeprowadzić badania zmęczeniowe dysków węglowych w zastawce i odnieść wyniki do przeprowadzonych już badań zmęczeniowych zastawek z dyskami polimerowymi. Należy kontynuować badania nad uzyskaniem jednorodnej struktury węgla szklanego poprzez prowadzenie procesu polimeryzacji w środowisku gazu obojętnego (argonu).

Aby potwierdzić dobre własności atrombogeniczne badanych materiałów i w związku z tym możliwość ich zastosowania w elementach konstrukcyjnych protez zastawek serca, należy kontynuować badania w kierunku oceny in vitro na krwi gotowych wyrobów medycznych, tj. prototypów protez zastawek serca wyposażonych w dyski wykonane z niemodyfikowanego PEEKu, PEEKu z warstwą DLC i z węgla szklanego.

Podziękowania

Prace zrealizowano w ramach:

1. zadań badawczych strategicznego rządowego programu wieloletniego na lata 2007-2012 pn.: „Polskie Sztuczne Serce” (NCBiR);

2. projektu rozwojowego pt. „Opracowanie typoszeregu dyskowych zastawek mechanicznych dla pediatrycznych komór wspomaganie serca” (13-0118/10/2011, NCBiR);

3. projektu badawczego „Węglowy dysk dla zastawki mechanicznej dla polskich komór wspomaganie serca” (N N518 285540, NCN).

Piśmiennictwo

- [1] Religa G.: Współczesne zastosowanie mechanicznego wspomaganie serca. *Kardiologia i Torakochirurgia Polska* 3 (2007) 206-210.
- [2] Gonsior M.: Obróbki jarzeniowe stopu tytanu Ti6Al4V w aspekcie zastosowania na pierścieni zastawki serca. Rozprawa doktorska.
- [3] Kapis A., Kustosz R., Bujok W., Jóźwik K., Obidowski D., Reorowicz P., Kłosiński P.: Blood pump in particular a pneumatic ventricular assist device; EP 2491966; Fundacja Rozwoju Kardiologii.
- [4] Rachwałik M., Biały D., Wawrzyńska M.: Mechaniczne protezy zastawek serca – historia i rozwój technologii. *Inżynieria Biomedyczna* 16, 3 (2010) 265-267.
- [5] Kobayashi, K.J., Williams, J.A., Nwakanma, L.U., Weiss: EuroSCORE predicts short- and mid-term mortality in combined aortic valve replacement and coronary artery bypass patients. *Journal of Cardiac Surgery* 24, 6 (2009) 637-643.
- [6] DeWall R.A., Qasim N., Carr L.: Evolution of mechanical heart valves. *The Annals of Thoracic Surgery* 69 (2000) 1612-1621.
- [7] Gott V.L., Alejo D.E., Cameron D.E. Mechanical heart valves: 50 years of evolution. *The Annals of Thoracic Surgery* 76 (2003) 2230-2239.
- [8] Nair K., Muraleedharan C.V., Bhuvaneshwar G.S.: Developments in mechanical heart valve prosthesis. *SADHANA - Academy Proceedings in Engineering Sciences* 28 (2003) 575-587.

Conclusions

The obtained fatigue test and thrombogenicity assessment results of polymer materials indicate that the polymer PEEK can be applied for the valve discs dedicated to short-term application (up to 12 months) in an extracorporeal pulsatile ventricular assist device. The application of a hard DLC layer seems to be the right direction to obtain more durable disc surface in contact with the titanium housing which is confirmed by the valves fatigue tests results. Based on the literature review it is advisable to develop a carbon valve disc for long-term application [4-8, 14, 15]. The performed micro hardness material examinations confirmed the high hardness of glassy carbon, dedicated to long-term application in Moll valves. In the next step of research, fatigue tests of carbon discs should be performed and the obtained results should be referred to the fatigue test of the polymers discs results. The production method tests of a uniform glassy carbon material should be performed in the inert gas environment (argon).

To confirm good thrombogenicity properties of investigated biomaterials and its application possibilities in heart valves prostheses, complementary in vitro blood tests should be performed of final medical devices, i.e. heart valves prototypes equipped with discs made from unmodified PEEK, PEEK with a DLC layer and glassy carbon.

Acknowledgments

This research work was realized within the confines of:

1. “Polish Artificial Heart” multiannual government strategic program 2007-2012;

2. research project “Development of tilting mechanical valve series for paediatric ventricular assist devices” (13-0118/10/2011, NCBiR);

3. research project “Mechanical valve carbon disc for Polish ventricular assist devices” (N N518 285540, NCN).

References

- [9] Strona internetowa: <http://www.invibio.com/biocompatible-polymers/peek-optima.php>
- [10] Kaczorowski W., Niedzielski P., Mitura S.: Wytwarzanie warstw węglowych w nowym reaktorze MW/RF. *Inżynieria Biomateriałów* 43-44 (2005) 29-32.
- [11] Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Kustosz R., Gonsior M.: Biocompatibility in vitro investigation of ReligaHeart EXT ventricular assist device structural polymers, treated with technological process. *Engineering of Biomaterials* 15 (2012) 57-61.
- [12] Kościelniak-Ziemniak M., Gorka K., Kustosz R., Wilczek P., R. Wojnicz, Reichman-Warmusz E., Wieczorek J., Kosenyuk J., Smorąg Z.: Ocena biogodności polimeru dedykowanego konstrukcji pulsacyjnych protez wspomaganie serca. Referat na Międzynarodowej konferencji BioMedTech Silesia, Zabrze, Polska (2011).
- [13] Kustosz R., Kościelniak-Ziemniak M., Janiczak K., Gawlikowski M.: Badania protez serca powstających w programie Polskie Sztuczne Serce. *Biuletyn Programu Polskie Sztuczne Serce* 6 (2011) 9-24.
- [14] Kaczorowski W., Batory D., Niedzielski P., Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Gawlikowski M., Kustosz R., Szuber A., Gonsior M.: Plasma surface modification of disc artificial heart valves by carbon-based coatings. Referat na seminarium „Nowe trendy w toksykologii – nanocząstki i nanomateriały” Łódź (2012).
- [15] Kościelniak-Ziemniak M., Wilczek P., Gawlikowski M., Wierchoń T., Szuber A., Kustosz R., Gonsior M.: Badania trombogenności in vitro materiałów tytanowych modyfikowanych powierzchniowo dla zastosowania w konstrukcji pierścieni mechanicznych protez zastawek serca typu Moll. Poster na III konferencji Katowickiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej “Postępy medycyny laboratoryjnej” Ustroń, Polska (2012).

POROWATE KOMPOZYTY POLIURETAN/ β -TCP DO ZASTO- SOWAŃ ORTOPEDYCZNYCH

PIOTR SZCZEPAŃCZYK*, KRZYSZTOF PIETRYGA,
KINGA PIELICHOWSKA*, JAN CHŁOPEK

AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW

AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

* E-MAIL: PSZCZEPA@AGH.EDU.PL, KINGAPIE@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Celem pracy było otrzymanie serii porowatych kompozytów o osnowie polimerowej modyfikowanych mikrocząstkami β trifosforanu (V) wapnia (β -TCP) oraz zbadanie ich właściwości pod kątem zastosowań ortopedycznych. Osnowę otrzymanych kompozytów stanowiły poliuretany ze względu na szereg zalet wynikających z ich budowy chemicznej, m.in. właściwości sprzyjające adhezji żywych komórek i ich proliferacji [1]. Ponadto poliuretany są grupą polimerów o wszechstronnych właściwościach, zmieniających się w zależności od użytych reagentów i średniej masy cząsteczkowej oraz o szerokim wachlarzu zastosowań. Dodatkową zaletą poliuretanów jest potencjalna możliwość wprowadzania ich w miejsce ubytku kostnego metodą iniekcijną [2]. Kompozyty otrzymywano na drodze jednoetapowej polimeryzacji w masie z 4,4'-diizocyjanianu difenylometanu (MDI), poli(glikolu etylenowego) (PEG) oraz 1,4-butanodiolu (BDO) jako przedłużacza łańcucha. Sulfonowany olej rycynowy (SCO) oraz stearynian wapnia (CS) zastosowano w celu lepszej kontroli porowatości i otrzymania układów o porach otwartych. Struktura otrzymanych materiałów została potwierdzona za pomocą spektroskopii w podczerwieni. Przy użyciu mikroskopu stereoskopowego oszacowano porowatość, ponadto zbadano wytrzymałość na ściskanie oraz przeprowadzono symulacje biologiczne w warunkach *in vitro*. Przeprowadzono również inkubację w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) w celu wstępnej oceny bioaktywności otrzymanych biomateriałów. Uzyskane wyniki potwierdziły znaczący wpływ dodatku β -TCP na właściwości mechaniczne otrzymanych układów jak również na poprawę ich bioaktywności. Ponadto zaobserwowano, że dodatek β -TCP, SCO oraz CS wpływa na porowatość całkowitą i rozmiary porów.

Słowa kluczowe: kompozyty, poliuretany, β -TCP, inżynieria tkankowa, regeneracja tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 33-41]

Wprowadzenie

Kość można rozpatrywać jako materiał kompozytowy, w którym organiczna część zbudowana głównie z kolagenu stanowi osnowę, a na niej w wyniku działalności komórek osadzana jest faza nieorganiczna głównie hydroksyapatyt. Część organiczna nadaje jej elastyczność, natomiast część mineralna podnosi twardość i odporność na ściskanie [3].

POROUS COMPOSITES POLYURETHANE/ β -TCP FOR ORTHOPAEDIC APPLICATIONS

PIOTR SZCZEPAŃCZYK*, KRZYSZTOF PIETRYGA,
KINGA PIELICHOWSKA*, JAN CHŁOPEK

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS

AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

* E-MAIL: PSZCZEPA@AGH.EDU.PL, KINGAPIE@AGH.EDU.PL

Abstract

The purpose of the research was to produce a series of porous composite samples with polymeric matrix modified by β -tri-calcium phosphate (β -TCP) microparticles and to study their properties considering orthopaedic applications. Polyurethanes were used as the polymeric matrix on account of their advantages resulting from their chemical structure. These materials also promote cell adhesion and proliferation [1]. Moreover these polymers exhibit wide-ranging properties which can be modulated depending on composition and average molecular weight and are used in broad spectrum of applications. Another advantage of polyurethanes is their potential to be injected into the bone defect by minimally invasive technique [2]. The composites were obtained through the one-step synthesis by mixing 4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI) with poly(ethylene glycol) (PEG) and 1,4-butanediol (BDO) as a chain extender. Sulphonated castor oil (SCO) and calcium stearate (CS) were applied for better porosity control and to obtain interconnected pore system. Structure of the synthesized materials was confirmed by means of infrared spectroscopy. The porosity was assessed using stereoscopic microscopy. Moreover the compressive strength was studied and *in vitro* simulation was carried out. Composite samples were also incubated in simulated body fluid (SBF) for preliminary evaluation of the *in vitro* bioactivity. The research results confirmed significant influence of β -TCP on mechanical properties and preliminary evaluation of the *in vitro* bioactivity of the obtained samples. Moreover the influence of β -TCP, SCO and CS on total porosity and pore sizes was investigated.

Keywords: polyurethanes, β -TCP, tissue engineering, bone tissue regeneration

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 33-41]

Introduction

Bone tissue may be regarded as a composite material where the organic phase is comprised basically of collagen on which mainly the inorganic one is deposited. The organic component provides the bone with flexibility and the inorganic one gives the bone its hardness and compressive resistance [3]. Bone possesses an excellent self-healing ability what allows broken bones to knit back together. However large bone defects are not able to heal by themselves. Critical-size bone defect is the smallest size tissue defect unable to get healed and spontaneously filled by properly regenerated bone tissue [4].

Tkanka kostna charakteryzuje się dużymi zdolnościami do samoregeneracji, co pozwala na zrastanie się odłamów przy złamaniach. Jednak istnieje tzw. krytyczna wielkość ubytku, w przypadku której nie ma możliwości samoistnego wypełnienia się ubytku prawidłowo zbudowaną tkanką kostną [4]. W takich sytuacjach stosuje się zwykle przeszczepy kości gąbczastej pobieranej z miednicy pacjenta, co z kolei może powodować uraz w miejscu pobrania i prowadzić do komplikacji.

W związku z wydłużającym się średnim czasem życia, rośnie liczba pacjentów mających problemy zdrowotne związane z układem kostnym [5]. Zważywszy na rosnącą ilość chorób i urazów układu kostnego coraz większą wagę poświęca się na zagadnienia związane z rekonstrukcją i regeneracją tkanki kostnej, a rozwój metod leczenia może przyczynić się do złagodzenia dolegliwości bólowych pacjentów, jak również do redukcji kosztów w leczeniu. W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój inżynierii tkankowej, która obejmuje zastosowanie podstaw i metod inżynierii oraz nauk biologicznych w celu zrozumienia zależności pomiędzy strukturą a funkcją w prawidłowej i patologicznej tkance oraz opracowanie biologicznych substytutów, umożliwiających naprawę lub regenerację tkanki lub organu, a w efekcie odzyskanie ich funkcjonalności [6]. Obecnie badane są biomateriały trzeciej generacji, do wytwarzania których, używa się głównie hydroksyapatytu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp), fosforanu triwapnia $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP), siarczanu wapnia CaSO_4 oraz przetwarzanych struktur koralowców [7]. Choć w wielu sytuacjach klinicznych ceramiczne substytuty kości są pomocne w gojeniu ubytków kostnych, to posiadają one szereg ograniczeń. Dlatego wciąż poszukuje się nowych, funkcjonalnych biologicznie substytutów tkanki kostnej na bazie polimerów bioresorbowalnych. Wszczepione do organizmu mają one stanowić chwilowe rusztowanie pomagające w wytworzeniu i odbudowie własnych tkanek przez organizm. Dlatego oprócz biokompatybilności powinny też tworzyć stabilną, porowatą trójwymiarową strukturę, a także degradować stopniowo w miarę tworzenia się nowej tkanki, jak również powinny sprzyjać adhezji i proliferacji komórek. W przypadku zastosowań ortopedycznych oraz stomatologicznych jedną z pożądanych cech biomateriałów jest również ich iniekcyjność. Pozwala to na wprowadzenie biomateriału w miejsce ubytku w postaci pasty o odpowiedniej konsystencji przez wstrzyknięcie, po czym następuje sieciowanie lub polimeryzacja wprowadzonej pasty *in situ*. Metoda ta pozwala na zaoszczędzenie czasu rekonwalescencji i umożliwia szybki powrót pacjenta do normalnej sprawności i aktywności [8].

Dla celów inżynierii tkankowej zastosowanie znajdują zarówno polimery naturalne, jak i syntetyczne, wśród których dużym zainteresowaniem cieszą się poliuretany. Zaletą tych materiałów jest ich biokompatybilność, a w warunkach *in vivo* mają ponadto zdolność do kalcyfikacji, co stanowi zaletę w potencjalnych zastosowaniach do hodowli tkanki kostnej. Istotną zaletą poliuretanów jest także możliwość projektowania ich właściwości fizycznych i mechanicznych wynikająca z ich budowy [9, 10]. Poliuretany przyjmują cechy elastomeru przy większej ilości segmentów giętkich, natomiast większa ilość segmentów sztywnych czyni je bardziej sztywnymi i twardymi [11]. W literaturze opisano badania w warunkach *in vitro* w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) sugerujące, że powierzchnia poliuretanów zawierających dłuższe segmenty sztywne pokrywała się większą ilością apatytów, co może świadczyć o wpływie budowy segmentowej poliuretanów na ich wstępną ocenę bioaktywności w warunkach *in vitro* [12]. Badania nad opracowaniem bioresorbowalnych poliuretanów, ich kompozytów z bioaktywną ceramiką oraz innych polimerów w zastosowaniach jako rusztowania do hodowli tkanki kostnej prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych, jednakże do tej pory nie znaleziono optymalnego rozwiązania.

Then autografts of cancellous bone from pelvis are usually used but it can cause an injury to the donor site and often results in a range of health problems.

With respect to extension of the average life span, there is also an increasing number of patients with bone diseases [5]. Rapidly growing frequency of bone injuries and fractures rivets scientific attention to the development of more effective bone reconstruction methods which might contribute to both alleviate patient's pain and to reduce costs for treatment. There's recently been an apparent dynamic development of tissue engineering which includes application of principles and methods of engineering and biological sciences in order to comprehend the relationships between structure and function of healthy and morbid tissue and to work out biological substitutes enabling tissue regeneration and recovering its functions [6]. Currently investigated third-generation biomaterials are based mainly on ceramic materials such as calcium phosphates (hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp) and tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (TCP)), calcium sulfate CaSO_4 and also processed coral exoskeletal matrix [7]. Ceramic bone substitutes are useful in bone defects healing but they still encounter many limits. Therefore new, biologically functional bone substitutes based on bioresorbable polymers are still sought-after. The next generation of biomaterials is aimed not only at the temporary replacement of tissue or organ functions but also at inducing autologous regeneration in the human organism. Therefore apart from biocompatibility they should also provide a stable, three-dimensional structure and gradually degrade as the new bone tissue regenerates. Scaffolds for bone tissue regeneration should be favourable to cell adhesion and proliferation. Injectability is one of the desirable features of biomaterials considering orthopaedic and dental applications. It enables to insert a paste-like composite which then can be rapidly cross-linked or polymerized *in situ*. Injectable scaffolds can be administered in a minimally invasive manner thereby shortening the recovery time for patients [8].

Both natural and synthetic polymers may be used for tissue engineering. Among the families of synthetic polymers, polyurethanes have been the most attractive for these applications. One of their advantages is hemocompatibility and they also stimulate calcification *in vivo* what is positive for bone regeneration applications. Polyurethane chemistry also enables interfacial binding between the polymer and filler phases. Their physical and mechanical properties may be tailored according to individual needs what stems from polyurethanes' structure [9, 10]. Polyurethane chains consist of soft segments, which contribute to their elastic properties and hard segments contributing to rigidity [11]. *In vitro* tests in Simulated Body Fluid (SBF) showed that surface of polyurethanes containing longer hard segments was covered with larger apatite crystals what might be a sign of the influence of their segmental structure on the preliminary evaluation of the *in vitro* bioactivity [12]. Many research institutes are interested in development of bioresorbable composites based on polyurethanes and other polymers with bioactive ceramics for bone tissue engineering applications but so far there is no optimal solution.

Toshitaka Yoshii et al. applied both hydroxyapatite and β -TCP to compare their influence on properties of polyurethane obtained from lysine-trisocyanate, polyester polyol based on 60% ϵ -caprolactone, 30% glycolide and 10% DL-lactide synthesized according to Guelcher et al. [13]. According to this study β -TCP influenced the cell viability and proliferation more than hydroxyapatite did [14]. In another study Adhikari et al. have worked out two-part injectable prepolymer systems specifically for orthopaedic applications. β -TCP not only improved mechanical properties in polyurethanes but also retarded the onset of *in vitro* and *in vivo* degradation [15].

Toshitaka Yoshii i współpracownicy zastosowali hydroksyapatyt oraz β -TCP w celu porównania ich wpływu na właściwości poliuretanu otrzymanego z triizocyjanianu lizyny, polioliu poliestrowego otrzymanego z mieszaniny zawierającej 60% ϵ -kapolaktonu, 30% kwasu glikolowego i 10% DL-laktydu wg metody Guelchera i wsp. [13]. Przeprowadzone badania pokazały korzystny wpływ β -TCP na żywotność komórek i ich proliferację w stosunku próbek zawierających hydroksyapatyt [14]. Adhikari z zespołem opracował dwukomponentowe iniekcyjne systemy poliuretanowe do zastosowań ortopedycznych, w których dodatek β -TCP nie tylko wpłynął na poprawę właściwości mechanicznych kompozytów, ale również wydłużył ich czas degradacji w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [15]. Według badań prowadzonych przez zespół Atilgana cząstki β -TCP i hydroksyapatytu nie powodowały reakcji typu około ciała obcego oraz wspomagały osteogenezę. Zaobserwowano ponadto, że hydroksyapatyt oraz β -TCP zwiększają absorpcję wody tworząc fazę przejściową pomiędzy polimerem i cząstkami ceramiki bioaktywnej, wpływając w sposób istotny na kinetykę degradacji materiału [16].

Celem niniejszej pracy było otrzymanie serii pianek poliuretanowych na drodze jednoetapowej syntezy z zastosowaniem 4,4'-diizocyjanianu difenylometanu (MDI) oraz poli(glikolu etylenowego) (PEG) o średniej masie cząsteczkowej 2000 oraz 1,4-butanodiolu jako potencjalnych materiałów do zastosowań ortopedycznych. W celu obliczenia receptury poliuretanu przyjęto założenie, że zawartość segmentów giętkich wynosi 40% [17]. Jako ceramiki bioaktywnej użyto β -TCP. Badania prowadzono na serii próbek o zawartości β -TCP w zakresie 0%-80% wagowych w stosunku do masy polimeru. Dodatkowo w celu poprawy mieszalności składników i kontroli porowatości zastosowano sulfonowany olej rycynowy (SCO) oraz stearynian wapnia (CS).

Materiały i metody

Otrzymywanie porowatych kompozytów

Do syntezy użyto 4,4'-diizocyjanianu difenylometanu (MDI), poli(glikolu etylenowego) o średniej masie cząsteczkowej (PEG 2000), 1,4-butanodiolu (BDO) wyprodukowanych przez Sigma-Aldrich. Mikrocząstki β -TCP o rozmiarach ok. 150 μm zostały wyprodukowane przez Fluka Chemie GmbH. Podczas syntezy przebiegały równocześnie dwie reakcje. Reakcja pomiędzy MDI a PEG prowadziła do wytworzenia wiązania uretanowego i w konsekwencji do powstania liniowego polimeru. W trakcie drugiej reakcji między MDI i wodą dochodziło do wydzielania CO_2 spieniającego materiał oraz powstania wiązania mocznikowego. Dla lepszej dyspersji substratów w mieszaninie jako związku powierzchniowo czynnego w każdym przypadku dodawano sulfonowanego oleju rycynowego (SCO) wyprodukowanego przez Fluka Chemie GmbH. Dodatek stearynianu wapnia (CS, wyprodukowany przez POCH S.A.) pozwalał na otrzymywanie pianek z otwartym systemem porów połączonych ze sobą, co ma istotne znaczenie dla inżynierii tkankowej.

W celu otrzymania kompozytów odważano odpowiednią ilość PEG, β -TCP, SCO oraz CS do plastikowego pojemnika, a następnie podgrzewano mieszaninę do temperatury 60°C. Po stopieniu PEG całość była dokładnie mieszana aż do momentu uzyskania jednolitej konsystencji. Następnie wprowadzono odpowiednią ilość BDO i ponownie mieszano. Jednocześnie w drugim pojemniku podgrzano do temperatury 50°C odważoną wcześniej odpowiednią ilość MDI w celu jego stopienia. Stopiony MDI został wprowadzony do przygotowanej mieszaniny i całość została intensywnie i dokładnie wymieszana, po czym następował wzrost pianki. Użyte ilości substratów przedstawiono w TABELI 1.

In work by Atilgan et al., the authors found that β -TCP and HA granules did not cause foreign body reaction and initiated osteogenesis. Moreover HA and β -TCP phase promoted the water absorption through the interface generated between the polymer and the more hydrophilic bioactive phases, thereby influencing the degradation kinetic of the material [16].

The aim of this study was to fabricate a series of polyurethane foams and to characterize them considering orthopedic applications. Polyurethane foams were obtained via one-step synthesis using 4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI), poly(ethylene glycol) (PEG) and 1,4-butanediol (BDO) as chain extender. The soft segments content was assumed to be present in an amount of 40% by weight in order to calculate the polyurethane foam formulation [17]. β -TCP microparticles were used as bioactive ceramics. Research was carried out on a series of composite samples differing only in β -TCP concentrations in the range 0%-80% (w/w). Sulphonated castor oil (SCO) and calcium stearate (CS) were additionally used for better miscibility and control of porosity.

Materials and Methods

Preparation of PUR/ β -TCP porous composite scaffolds

4,4'-diphenylmethane diisocyanate (MDI), poly(ethylene glycol) of average molecular weight amounting to 2000 (PEG 2000) and 1,4-butanediol were obtained from Sigma-Aldrich. β -TCP microparticles (with particle size ca 150 μm) were produced by Fluka Chemie GmbH. Two reactions proceeded simultaneously during synthesis. Reaction between MDI and PEG led to linear polymer followed by urethane linkage formation. Second reaction between MDI and H_2O led to urea linkage and CO_2 which foamed the material. Sulphonated castor oil (Fluka Chemie GmbH) was added as a surfactant for better substrates miscibility. Calcium stearate (POCH S.A.) caused open-celled porosity formation what is significant for orthopedic applications.

PEG, β -TCP, SCO and CS were weighed and then added to a reaction vessel. The mixture was warmed up to 50°C in order to melt PEG followed by BDO addition and homogenization. Weighed amount of MDI was molten in temperature of 40°C and then added to the mixture containing PEG followed by intensive mixing and foam rising. The amounts of substrates used for synthesis are presented in TABLE 1.

TABELA 1. Ilościowe proporcje substratów stosowanych w syntezie.

TABLE 1. Quantitative proportions of substrates used in the synthesis.

β -TCP [%]	PEG [g]	MDI [g]	BDO [g]	β -TCP [g]	SCO [g]	CS [g]
0	8.00	9.09	2.91	0	0.12	0.06
20				4		
40				8		
60				12		
80				16		

FTIR

Pomiary FTIR przeprowadzono w pastylkach z KBr za pomocą aparatu Vertex 70v (Bruker) w temperaturze pokojowej w zakresie 4000-350 cm^{-1} przy rozdzielczości 4 cm^{-1} .

Mikroskopia stereoskopowa

Wielkość porów poszczególnych materiałów określono przez obserwacje ich powierzchni za pomocą refleksyjnego mikroskopu stereoskopowego przy powiększeniu 15x (StereoDiscovery V.8, Zeiss, Niemcy), wyposażonego w aparat cyfrowy (Canon PS A620) i pomiar wielkości porów przy użyciu programu Pixel Fox. Na podstawie obrazów mikroskopowych określono porowatość oraz średnice porów i rozkład wielkości porów. W celu określenia porowatości otrzymanych materiałów posłużono się metodą planimetryczną obrazów mikroskopowych powierzchni przekroju próbek. Zmierzone powierzchnie porów widocznych na przekroju i odniesiono je do całkowitej powierzchni analizowanych obrazów.

Badania mechaniczne

Próbki w kształcie sześciątów o wymiarach wskazanych przez normę ISO 3167 ok. 10x10x10 mm poddano badaniom mechanicznym przy użyciu uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick w opcji ściskania statycznego przy szybkości 1 mm/min w temperaturze pokojowej wg zaleceń normy ISO 527. Dane pomiarowe obrabiano w programie MS Excel. Moduł Younga wyznaczano z kąta nachylenia krzywej w układzie współrzędnych naprężenie-odkształcenie w początkowym odcinku gdzie ma ona charakter liniowy. Moduł Younga jest określony przez stosunek przyrostu naprężenia do odpowiadającego mu przyrostu wydłużenia. Wyniki badań były średnią z trzech pomiarów.

Badanie nasiąkliwości

Nasiąkliwość określana była jako stosunek masy zaabsorbowanej wody przez próbkę materiału do masy próbki w stanie suchym. Plasterki wycięte z każdego materiału o grubości 2 mm ważono na wadze analitycznej następnie inkubowano w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej przez okres 7 dni. Po inkubacji próbki osuszono za pomocą ręcznika papierowego w ten sposób, by wyeliminować całą wodę zawartą w porach materiału. Osuszone w ten sposób próbki ponownie zważono, a procentowy przyrost masy w stosunku do wyjściowej masy próbek określa stopień nasiąkliwości.

Wstępna ocena bioaktywności w warunkach *in vitro*

Dla oceny bioaktywności otrzymanych biomateriałów prowadzono inkubację w świeżo sporządzonym roztworze SBF (Simulated Body Fluid) o zbliżonych stężeniach jonów soli nieorganicznych do tych, które znajdują się w osoczu krwi ludzkiej. Tworzenie się apatytów na powierzchni materiału w wyniku inkubacji w SBF stanowi wstępną ocenę bioaktywności przed badaniami *in vivo* mającą na celu zmniejszenie ilości eksperymentów przeprowadzanych na zwierzętach [18]. Próbki były inkubowane przez okres 2 tygodni w stałej temperaturze 37°C. Roztwór SBF wymieniano co 3-4 dni. Zmiany zachodzące na powierzchni materiałów obserwowano za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego Nova Nano SEM 200 firmy FEI. Próbki przed pomiarami SEM dokładnie wysuszono i napyłono warstwą węgla.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy

FTIR measurement was carried out with KBr pellets using Vertex 70v (Bruker) at room temperature in the range of 4000-350 cm^{-1} (resolution: 4 cm^{-1}).

Stereoscopic microscopy

Pore sizes were assessed via stereoscopic microscopy observations at 15x power (StereoDiscovery V.8, Zeiss, Germany) equipped with a digital camera (Canon PS A620). Pixel-fox software was used for measurement of pore size distribution. Determination of pore diameters and pore size distribution was based on microscopic observations. Planimetric method was used for porosity determination of the obtained materials. Surfaces of pores visible on the cross-section were measured and then related to the whole surface of analyzed image.

Mechanical tests

Compression tests were carried out using an universal mechanical testing machine Zwick at constant testing speed 1 mm/min and room temperature according to the international standard ISO 527. Cube-shaped samples measured 10 mm long, 10 mm wide and 10 mm high according to the international standard ISO 3167. The Young's modulus was determined from the ratio of stress to strain within the elastic region of the stress-strain curve. Young's Modulus is defined as the ratio of compressive stress to compressive strain. Three measurements were carried out for every sample type and then the results were averaged.

Water soaking test

Water soaking was defined as the ratio of mass of absorbed water to mass of dry sample. 2 mm thick slices of composite were weighed using an analytical scale and then incubated for 7 days in distilled water at room temperature. Having finished the incubation, the samples were dried and then weighed again to determine a percentage increase in weight what showed the degree of water uptake.

Preliminary evaluation of the *in vitro* bioactivity

Samples were incubated at 37°C for 2 weeks in Simulated Body Fluid (SBF) with ion concentrations nearly equal to those of human blood plasma. Apatites generation on material surface during SBF incubation is only a preliminary assessment of bioactivity carried out before *in vivo* test. It reduces the amount of experiments carried out with animals [18]. SBF was exchanged every 3-4 days during incubation. Having finished the incubation, samples were observed using a scanning electron microscope FEI Nova Nano SEM 200 in order to see changes which occurred during incubation. All samples were dried and coated with a thin layer of carbon before SEM measurement.

Results and Discussions

Structure of the obtained samples was confirmed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FIG. 1).

Strong peak over the range of 3450-3330 cm^{-1} was assigned to N-H stretching vibrations what is characteristic for polyurethanes. There were also peaks located at 1522 cm^{-1} corresponding to secondary amides and at 1239-1225 cm^{-1} corresponding to tertiary amides what might be a sign of cross links between polyurethane chains. Peaks around 2934 and 2850 cm^{-1} indicated presence of symmetric and asymmetric stretching vibrations of the CH_2 group. Vibrations of the C-O-C group appear at 1044-1039 cm^{-1} . Presence of symmetric and asymmetric stretching vibrations characteristic for soft segments was confirmed by occurring bands at 2934 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} [19].

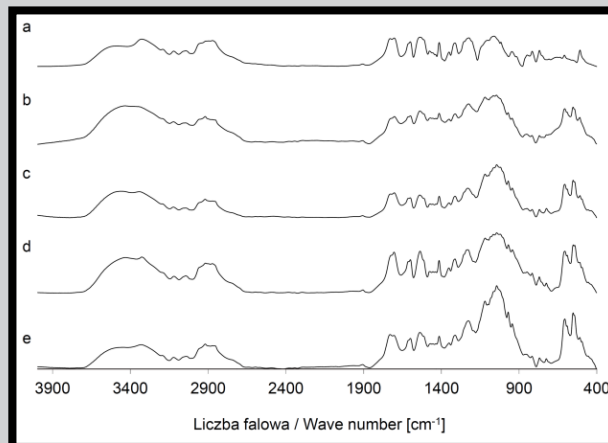
Wyniki i dyskusja

Strukturę otrzymanych materiałów potwierdzono wykonując widma w podczerwieni (RYS. 1).

Zarejestrowano sygnały w zakresie $3450\text{--}3330\text{ cm}^{-1}$ charakterystyczne dla poliuretanów pochodzące od drgania rozciągającego N-H. Zlokalizowano również pasma przy 1522 cm^{-1} pochodzące od 2-rzędowych grup amidowych oraz przy $1239\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od 3-rzędowych grup amidowych i świadczące o usieciowaniu łańcuchów poliuretanowych. Pasma o liczbie falowej 2934 i 2850 cm^{-1} świadczyły o obecności rozciągających drgań symetrycznych i asymetrycznych CH_2 , natomiast drgania wiązania C-O-C zostały potwierdzone przez obecność sygnałów w zakresie $1044\text{--}1039\text{ cm}^{-1}$. Na podstawie pasm przy 2934 cm^{-1} oraz 2850 cm^{-1} potwierdzono obecność asymetrycznych i symetrycznych drgań rozciągających charakterystycznych dla segmentów giętkich w poliuretanie [19]. Zaobserwowano stałą intensywność wyżej wymienionych pasm, co potwierdziło taką samą zawartość segmentów giętkich we wszystkich próbkach kompozytowych. Dodatkowo wraz ze wzrostem zawartości β -TCP zaobserwowano wzrost intensywności pasm w zakresie $1039\text{--}1023\text{ cm}^{-1}$, 603 cm^{-1} , 560 cm^{-1} . Są to typowe pasma pochodzące od drgań zginających i rozciągających grupy PO_4^{3-} [20]. Silne pasmo pochodzące od β -TCP występuje także przy 1040 cm^{-1} i nakłada się na charakterystyczne sygnały dla grupy C-O-C. Zaobserwowane niewielkie pasma w zakresie $1700\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ potwierdziły obecność fazy Ca-O w strukturze [21]. Na widmach brakuje charakterystycznego dla MDI sygnału przy 2270 cm^{-1} , co świadczy o całkowitym przereagowaniu grup izocyjanianowych. W otrzymanych kompozytach na bazie poliuretanów faza ceramiczna β -TCP jest powiązana poprzez oddziaływania fizyczne z polimerem. W widmach IR nie stwierdzono obecności wiązań chemicznych pomiędzy poliuretanem i β -TCP [22, 23].

Na histogramach (RYS. 2) przedstawiono ilość porów mających średnice w poszczególnych przedziałach.

Dla badanych układów zaobserwowano nieregularne pory o średniej średnicy ok. $800\text{ }\mu\text{m}$ w próbkach nie zawierających β -TCP lub małe jego ilości. Całkowita porowatość otrzymanych pianek wynosiła $65\text{--}75\%$. Zaobserwowano, że dodatek β -TCP znacząco wpływał na średnią wielkość porów. We wszystkich próbkach występowały pory o średnicy w zakresie $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ (RYS. 2). Najmniejsze pory zaobserwowano w próbce o zawartości 40% β -TCP. Badania prowadzone przez Turhani [24] wykazały, że zarówno stopień międzypołączeń, jak i rozmiary porów determinują penetrację i proliferację komórek wewnątrz porowatych rusztowań o osteokonduktywnych właściwościach. W świetle wyników badań przedstawionych w literaturze można przypuszczać, iż otwarta porowata struktura otrzymanych materiałów, a w szczególności rozmiary porów mogą sprzyjać wzrostowi nowej tkanki kostnej. W próbkach wraz ze wzrostem zawartości β -TCP widoczne są zmiany rozkładu średnic porów. W próbkach zawierających 40% oraz 60% β -TCP zakres średnic porów jest największy. W całej serii badanych kompozytów oprócz próbki zawierającej 20% β -TCP największy udział miały pory o średnicy w zakresie $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$, który jest najkorzystniejszy dla celów regeneracji tkanki kostnej. Jedynie w próbce zawierającej 60% β -TCP nie było porów o średnicy poniżej $200\text{ }\mu\text{m}$, które to sprzyjałyby tworzeniu tkanki włóknisto-naczyniowej. Otrzymane wyniki wskazują na możliwość wpływu na średnice porów poprzez dodatek różnej ilości β -TCP, a średnice porów w otrzymanych materiałach są optymalne dla zastosowań ortopedycznych [25].



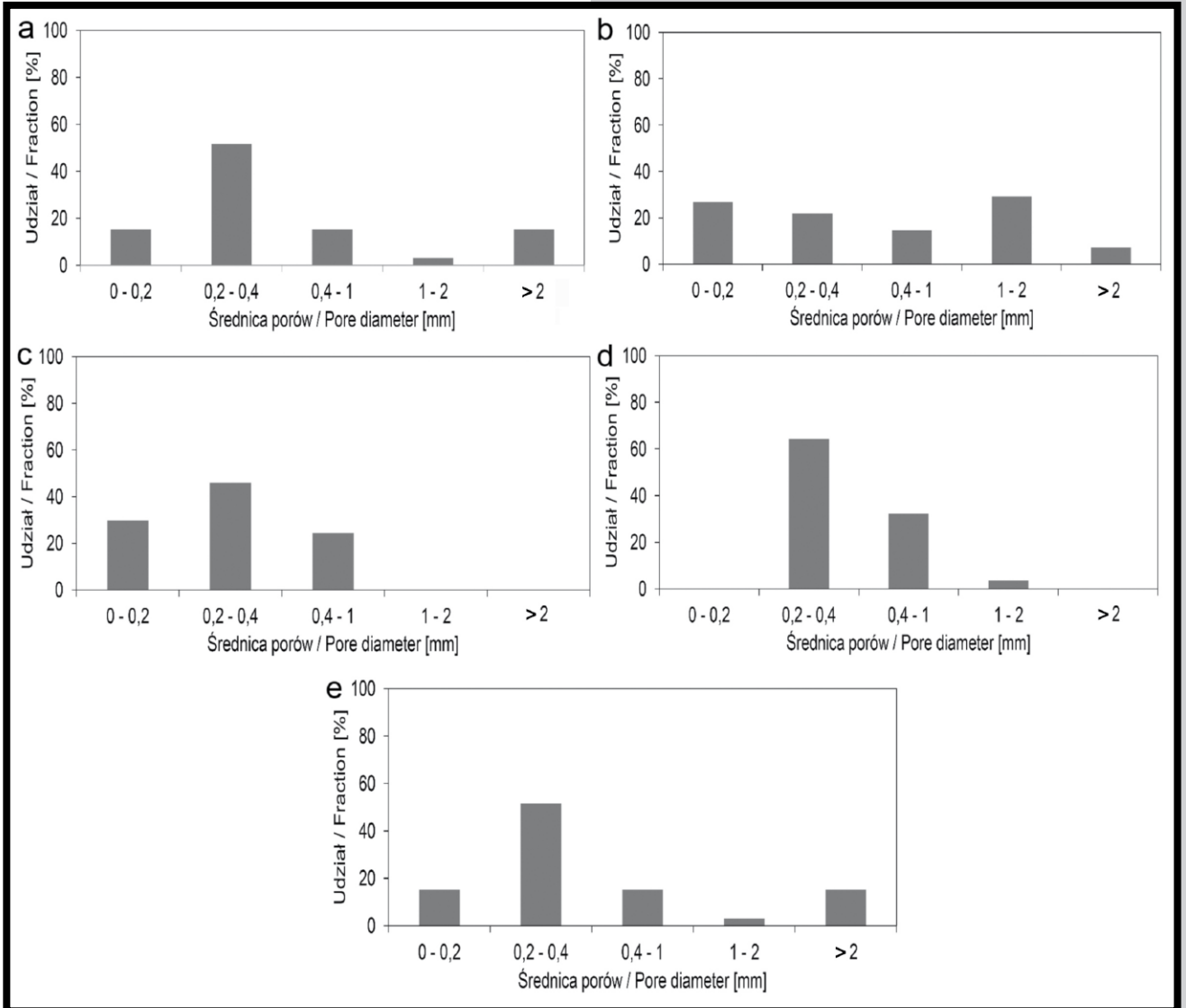
RYS. 1. Widma FTIR dla otrzymanych kompozytów o zawartościach β -TCP: a) 0%, b) 20%, c) 40%, d) 60%, e) 80%.

FIG. 1. FTIR spectra of the fabricated composites with β -TCP content of: a) 0%, b) 20%, c) 40%, d) 60%, e) 80%.

Constant intensity of the above mentioned peaks confirmed constant soft segment content in all composite samples. Additionally increasing peak intensities at $1039\text{--}1023\text{ cm}^{-1}$, 603 cm^{-1} , 560 cm^{-1} were observed with the increasing β -TCP content. These are typical peaks derived from bending and stretching vibrations of the PO_4^{3-} group [20]. Strong peak at 1040 cm^{-1} also derives from β -TCP and it overlaps another one derived from vibrations of the C-O-C group. Bands over the range of $1700\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ confirmed presence of the Ca-O phase in structure [21]. As expected, the isocyanate stretch at 2270 cm^{-1} was absent in the composites indicating that the isocyanate groups have completely reacted. The ceramic phase is connected with polymer via physical interaction. Infrared spectra didn't show presence of chemical bindings between polyurethane chains and β -TCP [22, 23].

Pore diameters are presented in different size ranges (FIG. 2).

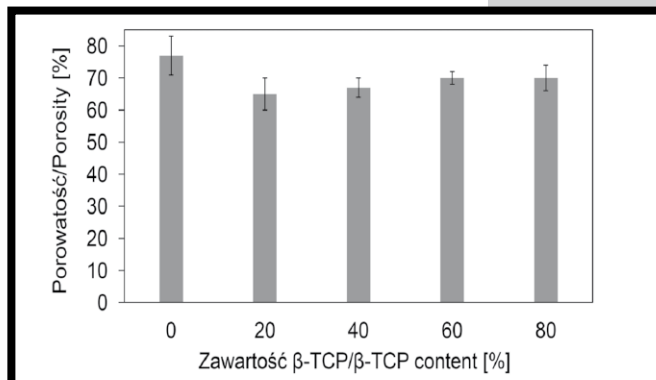
Samples with the lower contents of β -TCP exhibited irregular pores having an average diameter of about $800\text{ }\mu\text{m}$. Total porosity of the obtained samples amounted to $65\text{--}75\%$. The addition of β -TCP had a significant effect on average pore size. All composite samples contained pores of about $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ (FIG. 2). The smallest pores were observed in samples containing 40% β -TCP. According to Turhani [24] both the extent of pore interconnectivity and pore sizes determined cellular penetration and proliferation within osteoconductive porous scaffolds. Having taken porous structure of the obtained composite sponges into consideration, they have potential for orthopaedic tissue engineering applications. Based on recent results interconnected porosity is supposed to favour new bone tissue growth. Samples with different β -TCP content exhibited different pore size distribution. Samples containing 40% and 60% β -TCP have been noticed to possess the narrowest pore diameter range. Pore diameters in the range of $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ showed the biggest percentage share in all samples apart from the one containing 20% β -TCP. In sample containing 60% β -TCP, there were no pore diameters smaller than $200\text{ }\mu\text{m}$ which could favour the fibrovascular tissue formation. Pore diameters in the range of $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ have been proved to be profitable for bone tissue regeneration. The obtained results indicated a possibility of influence on pore diameters via different β -TCP content and the pore diameters are optimal for orthopaedic applications [25].



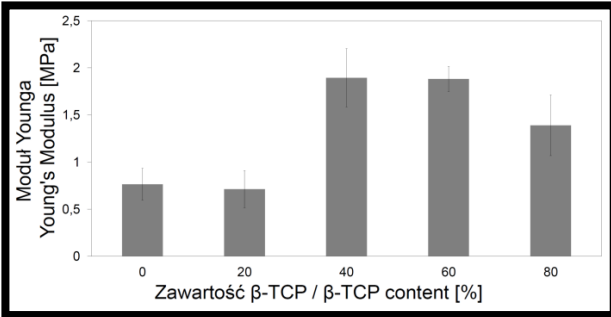
**RYS. 2. Rozkład wielkości porów w kompozytach o zawartości β -TCP: a) 0%, b) 20%, c) 40%, d) 60%, e) 80%.
FIG. 2. Pore size distribution of composite samples with β -TCP content of: a) 0%, b) 20%, c) 40%, d) 60%, e) 80%.**

Całkowita porowatość została obliczona na podstawie pomiaru powierzchni porów widocznych w przekroju próbki, którą odniesiono do całej powierzchni analizowanego przekroju – RYS. 3. Do oznaczenia porowatości posłużono się procedurą opisaną w literaturze [26]. Próbka bez dodatku β -TCP charakteryzowała się największą porowatością. Próbki o zawartościach β -TCP od 20% do 80% charakteryzowały się mniejszą porowatością w stosunku do próbki bez dodatku β -TCP jednak stopniowo rosnącą. Próbki zawierające 60% oraz 80% β -TCP wykazywały tę samą porowatość. Otrzymane wyniki wskazują, że poprzez dodatek różnych ilości β -TCP można wpływać na całkowitą porowatość.

Porosity was calculated on the basis of measurement of pore surfaces visible on the cross section in relation to the whole surface of the analyzed cross section – FIG. 3. Procedure described in the literature [26] was used for porosity determination. Samples without β -TCP exhibited the biggest porosity. Samples containing β -TCP in the range of 20%-80% demonstrated lower porosities which gradually increased with increasing β -TCP content. Samples containing 60% and 80% β -TCP exhibited the same porosity. Porosity might be influenced by addition of different amounts of β -TCP according to the obtained results.



**RYS. 3. Porowatość wyznaczona na podstawie obrazów mikroskopowych.
FIG. 3. Determined porosity based on microscopic images.**

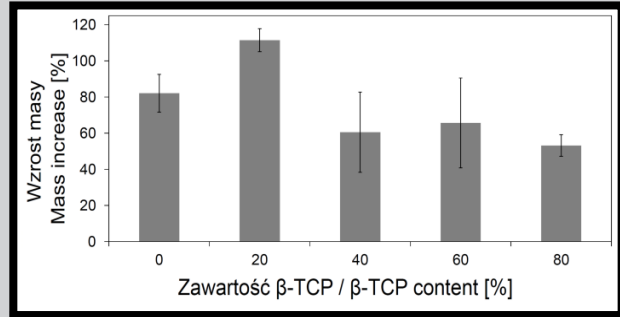


RYS. 4. Obliczony moduł Younga na ściskanie.
FIG. 4. Calculated Young's modulus in compression tests.

Obliczony moduł Younga dla próbek poddawanych na sucho próbie na ściskanie wyznaczano na podstawie zależności naprężenia od odkształcenia (RYS. 4). Zaobserwowano, że dodatek β-TCP powodował zwiększenie sztywności materiału z drugiej strony jednak wpływał na wielkości porów, co jest zgodne z danymi literaturowymi [15,27]. Zarówno całkowita porowatość, jak i rozkład wielkości porów miały wpływ na właściwości mechaniczne kompozytów. Tendencja wzrostu modułu wraz ze wzrostem zawartości ceramiki w kompozycie została potwierdzona również w badaniach prowadzonych przez Yamadi [28]. Badania pokazały, iż kompozyty o zawartości β-TCP 40-60% wykazywały największy moduł, natomiast próbka zawierająca 80% β-TCP miała mniejszy moduł w stosunku do tych o zawartości β-TCP 40%-60%.

Następnie oznaczono ilość wody, która wniknęła do materiału poprzez określenie wzrostu masy próbki po 7 dniowej inkubacji w wodzie. Określenie nasiąkliwości pozwala przewidzieć w jaki sposób zmienia się struktura materiału w środowisku wodnym - materiał o dużej nasiąkliwości szybciej i łatwiej ulega degradacji w warunkach in vivo [29]. Dodatek β-TCP w niektórych kompozytach wpływa na zwiększenie nasiąkliwości, co zostało potwierdzone w badaniach wykonanych przez Yong Bok Kim [30] oraz Raju Adhikari [15] z zespołami. Dla badanych próbek nasiąkliwość zależała od ilości wprowadzonego β-TCP - RYS. 5. Ze względu na hydrofilowość poli(glikolu etylenowego) próbki bez mikrocząstek ceramiki β-TCP lub z mniejszymi jej ilościami mogły pochłaniać większe ilości wody w porównaniu do próbek gdzie zawartość ceramiki była większa. Przedstawione wyniki mogą świadczyć o mniejszej hydrofilowości jaką wykazuje ceramika β-TCP w porównaniu do poli(glikolu etylenowego) [22,31].

Następnie przeprowadzono wstępną ocenę bioaktywności otrzymanych układów. Bioaktywność definiowana jest wg literatury jako zdolność materiału do wywołania specyficznej odpowiedzi na granicy faz tkanka-implant co skutkuje utworzeniem wiązania chemicznego pomiędzy materiałem i żywą tkanką [32]. Przez okres 2 tygodni prowadzono inkubację próbek w SBF, po czym obserwowano ich powierzchnię za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (RYS. 6). Na powierzchni wszystkich badanych próbek po inkubacji w SBF stwierdzono obecność apatytów. Zaobserwowano, że intensywność wzrostu silnie zależała od stanu powierzchni materiału. Materiał bez β-TCP jest bardziej gładki, przez co na jego powierzchni w większości nie zaobserwowano struktur apatytowych. W przypadku próbki zawierającej 60% β-TCP materiał pokrywa warstwa apatytu zarówno we wnętrzach porów jak i na powierzchniach przekroju. Spowodowane było to dużą chropowatością powierzchni wywołaną przez obecność mikrocząstek β-TCP. W badaniach potwierdzono pozytywny wpływ β-TCP na wzrost bioaktywności otrzymanych kompozytów [14].

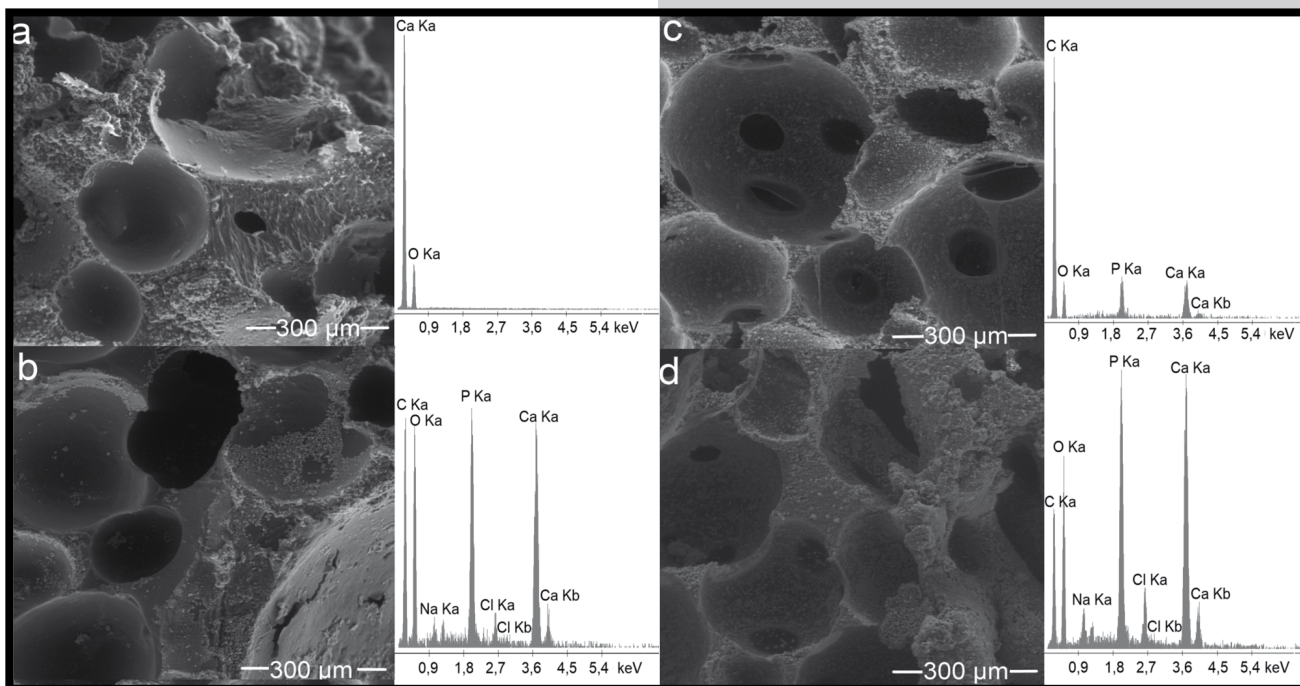


RYS. 5. Nasiąkliwość określona dla próbek na podstawie przyrostu masy.
FIG. 5. Soaking pliancy determined upon mass increase during incubation.

Compression testing was used to determine the stress/strain behaviour of composite sponges. The tangent modulus of the initial, linear portion of a stress-strain curve is called Young's modulus. It was experimentally determined from the slope of a stress-strain curve created during compression tests conducted on dry samples (FIG. 4). Addition of β-TCP was observed to increase material's stiffness and had effect on pore sizes what is compliant with references [15,27]. Both total porosity and pore size distribution influenced mechanical properties of composites. The modulus was found to increase with increasing ceramics content. The same tendency was observed by Yamadi [28]. Samples containing 40-60% β-TCP exhibited the largest Young's modulus, while the one containing 80% β-TCP had lower modulus in comparison with those with β-TCP 40%-60%.

The weight gain during soaking process was determined. Water-holding capacity assessment allowed to predict the in vivo deformation behaviour [29]. Big absorption capacity makes materials more prone to in vivo degradation. β-TCP tends to increase water uptake what was also confirmed by Yong Bok Kim et al. [30] and Raju Adhikari et al. [15]. Absorption capacity depended on β-TCP content in studied samples - FIG. 5. Due to hydrophilicity of poly(ethylene glycol), samples without and containing smaller amounts of β-TCP could absorb more amounts of water in comparison with those containing more ceramics. Presented results can prove lower hydrophilicity of β-TCP in comparison with polyethylene glycol [22,31].

Bioactivity is defined as the ability of a material to elicit a specific response at the implant-tissue interface causing chemical binding generation between the material and the living tissue [32]. One-week incubation in SBF was carried out and then samples were observed using scanning electron microscope (FIG. 6) in order to confirm presence of apatites on their surface. SEM micrographs allowed to view apatites formed on the surface. Quantity of the apatites also depended on surface roughness. Sample without β-TCP was smoother thus apatites were found in small quantities. When it comes to sample containing 60% β-TCP, the material was covered with an abundant apatite layer both within the pores and on the surface. Large roughness, which was caused by the presence of β-TCP microparticles, facilitated apatites formation. Research confirmed the positive impact of β-TCP on improvement of bioactivity of the obtained composite samples [14].



RYS. 6. Mikrofotografie SEM i wyniki analizy EDX przekroju kompozytów przed inkubacją: a) 0% β -TCP, c) 60% β -TCP, oraz po inkubacji b) 0% β -TCP, d) 60% β -TCP.

FIG. 6. SEM micrographs and EDX results of cross-section of composites before incubation: a) 0% β -TCP, c) 60% β -TCP, and after incubation: b) 0% β -TCP, d) 60% β -TCP.

Wnioski

W niniejszej pracy otrzymano serię porowatych kompozytów zawierających β -TCP o osnowie poliuretanowej dodatkowo modyfikowanych sulfonowanym olejem rycynowym oraz stearynianem wapnia. Przeprowadzono charakterystykę otrzymanych materiałów kompozytowych pod kątem wpływu dodatku bioaktywnej ceramiki na właściwości zarówno fizykochemiczne, jak i biologiczne kompozytów. Za pomocą spektroskopii w podczerwieni potwierdzono strukturę poliuretanów oraz brak wiązań chemicznych pomiędzy napełniaczem a osnową polimerową. Potwierdzono, że poprzez zmianę ilości dodawanego β -TCP można wpływać zarówno na średnicę porów, jak i ich rozkład oraz całkowitą porowatość. Zmianie ulegają również właściwości mechaniczne. Testy w warunkach *in vitro* potwierdziły pozytywny wpływ dodatku ceramiki na wstępną ocenę bioaktywności w warunkach *in vitro* otrzymanych materiałów. Wprowadzenie SCO i CS pozwoliło na uzyskanie materiałów kompozytowych o pożądanej porowatości i jednolitych właściwościach w całej objętości pianki w porównaniu do próbek bez dodatku SCO i CS [33]. Otrzymane wyniki wskazują na celowość dalszych badań, m.in. optymalizacji warunków prowadzenia reakcji i wprowadzenia kolejnych modyfikacji w celu otrzymania materiałów o optymalnych właściwościach do zastosowań ortopedycznych wprowadzanych do organizmu iniekcyjnie.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach badań statutowych 11.11.160.256 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Conclusions

The aim of this study was to fabricate a series of porous polyurethane composites containing β -TCP additionally modified with sulphonated castor oil and calcium stearate. Characteristics of materials has been carried out considering the influence of bioactive ceramics on physicochemical and biological properties. Infrared spectroscopy confirmed structure of polyurethanes and lack of chemical bindings between filler and polymer matrix. Different amounts of added β -TCP may influence pore diameter, pore size distribution and porosity. Mechanical properties also undergo changes. *In vitro* tests for preliminary assessment of bioactivity confirmed positive influence of ceramics on apatite formation. Addition of SCO and CS allowed to obtain composite materials of desirable porosity and uniform properties over the whole volume of foam in comparison to samples unmodified with SCO and CS [33]. Obtained results justify further investigation on i.a. optimization of reaction conditions and incorporation of another modifications in order to obtain materials of optimal properties for orthopaedic applications which might be injected into the organism.

Acknowledgements

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

- [1] Pereira I.M., Gomide V., Oréfice R.L., De Fátima Leite M., Arcoverde Cavalcanti Zonari A., Goes A.M.: Proliferation of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on polyurethanes with tunable biodegradability. *Polímeros* 20 (2010) 280-286.
- [2] Hafeman A.E., Li B., Yoshii T., Zienkiewicz K., Davidson J.M., Guelcher S. A.: Injectable Biodegradable Polyurethane Scaffolds with Release of Platelet-derived Growth Factor for Tissue Repair and Regeneration. *Pharmaceutical Research* 25 (2008) 2387-2399.
- [3] Turner C.H., Burr D.B., *Experimental Techniques for Bone Mechanics*, in *Bone Mechanics Handbook*, Second Edition, C. S. C., Editor. 2001, CRC Press. p. 7-1-7-35.
- [4] Łysiak-Drwal K., Dominiak M., Malicka B., Konopka T.: Estimation of the influence of bone defects' dimensions on the healing outcome – 1-year observations. *Journal of Stomatology* 63 (2010) 365-376.
- [5] Greenwald A.S., Boden S.D., Goldberg V.M., Khan Y., Laurencin C.T., Rosier R. N., American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants.: Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume* 83 (2001) 98-103.
- [6] Chapekar M.S.: Tissue engineering: challenges and opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research* 53 (2000) 617-620.
- [7] Hench L.L., Polak J.M.: Third-generation biomedical materials. *Science* 295 (2002) 1014-1017.
- [8] Navarro M., Michiardi A., Castaño O., Planell J.A.: Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface* 5 (2008) 1137-1158.
- [9] Szelest-Lewandowska A., Masiulianis B., Klocke A., Glasmacher B.: Synthesis, Physical Properties and Preliminary Investigation of Hemocompatibility of Polyurethanes from Aliphatic Resources with Castor Oil Participation. *Journal of Biomaterials Applications* 17 (2003) 221-236.
- [10] Król P.: Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. *Progress in Materials Science* 52 (2007) 915-1015.
- [11] Zdrahala R.J. Zdrahala I.J.: Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and a vibrant future. *Journal of Biomaterials Applications* 14 (1999) 67-90.
- [12] Ryszkowska J., Auguścik M.: Właściwości poliuretanów do zastosowań jako podłoża do hodowli tkanek kostnych. *Czasopismo Techniczne. Mechanika R.* 106, z. 1-M (2009) 287-293.
- [13] Guelcher S.A., Patel V., Gallagher K.M., Connolly S., Didier J.E., Doctor J.S., Hollinger J.O.: Synthesis and in vitro biocompatibility of injectable polyurethane foam scaffolds. *Tissue Engineering* 12 (2006) 1247-1259.
- [14] Yoshii T., Dumas J.E., Okawa A., Spengler D.M., Guelcher S.A.: Synthesis, characterization of calcium phosphates/polyurethane composites for weight-bearing implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100 (2012) 32-40.
- [15] Adhikari R.: Biodegradable injectable polyurethanes: Synthesis and evaluation for orthopaedic applications. *Biomaterials* 29 (2008) 3762-3770.
- [16] Atilgan S., Yaman F., Yilmaz U., Görgün B., Ünlü G.: An experimental comparison of the effects of calcium sulphate particles and β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite granules on osteogenesis in internal bone cavities. *Biotechnology* 21 (2007) 205-210.
- [17] Wirpsza Z.: *Poliuretany: chemia, technologia, zastosowanie*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
- [18] Kokubo T., Takadama H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27 (2006) 2907-2915.
- [19] Liu J., Ma D., Li Z.: FTIR studies on the compatibility of hard-soft segments for polyurethane-imide copolymers with different soft segments. *European Polymer Journal* 38 (2002) 661-665.
- [20] Rehman I., Bonfield W.: Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8 (1997) 1-4.
- [21] Sheikh F.A., Kanjwal M.A., Macossay J., Barakat N.A.M., Kim H.Y.: A simple approach for synthesis, characterization and bioactivity of bovine bones to fabricate the polyurethane nanofiber containing hydroxyapatite nanoparticles. *eXPRESS Polymer Letters* 6 (2012) 41-53.
- [22] Abou Neel E.A., S.V., Revell P.A., Young A.M., Viscoelastic and biological performance of low-modulus, reactive calcium phosphate-filled, degradable, polymeric bone adhesives. *Acta Biomaterialia*, 2012. 8(1): p. 313-320.
- [23] de Oliveira A.A.R., d.C.S.M., de Fátima Leite M., Oréfice R.L., de Magalhães Pereira M., Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100, 5 (2012) 1387-1396.
- [24] Turhani D., Weißenböck M., Watzinger E., Yorit K., Cvikl B., Ewers R., Thurnher D.: In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 34 (2005) 543-550.
- [25] Huttmacher D. W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
- [26] Zhang J., Doll B.A., Beckman E.J., Hollinger J.O.: A biodegradable polyurethane-ascorbic acid scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67 (2003) 389-400.
- [27] Bonzani I.C.: Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials* 28 (2007) 423-433.
- [28] Yamadi S., Kobayashi S.: Effects of strain rate on the mechanical properties of tricalcium phosphate/poly(L-lactide) composites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 67-74.
- [29] Middleton J.C., Tipton A.J.: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.
- [30] Yong B.K., GeunHyung K.: Functionally graded PCL/ β -TCP biocomposites in a multilayered structure for bone tissue regeneration. *Applied Physics A: Materials Science & Processing* 108 (2012) 949-959.
- [31] Gorna K., Gogolewski S.: Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders. *Journal of Biomedical Materials Research* 60 (2002) 592-606.
- [32] Wu C., Xiao Y.: Evaluation of the in vitro Bioactivity of Bioceramics. *Bone and Tissue Regeneration Insights* 2 (2009) 25-29.
- [33] Szczepańczyk P., Pietryga K., Pielichowska K., Chłopek J.: Synthesis and characterization of injectable bioresorbable β -TCP/PUR foams. *Modern polymeric materials for environmental applications : 5th International Seminar Kraków, 15-17 May 2013 including COST MP1105 workshop „Nanoparticles for flame retardancy: challenges and risks”* 5 (2013) 339-346.

SYNTEZA ENZYMATYCZNA MULTIBLOKOWEGO KOPOLIMERU POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU-CO-GLIKOLU ETYLENOWEGO) (PBS-EG) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZEPU CANDIDA ANTARCTICA

BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY*

ZACHODNIOPOMORSKI UNIWERSYTET TECHNOLOGICZNY W SZCZECINIE, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, CENTRUM DYDAKTYCZNO-BADAWCZE NANOTECHNOLOGII, AL. PIASTÓW 45, 71-311 SZCZECIN

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

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania nad syntezą segmentowego kopolimeru (estrowo-eteru) – poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG) z użyciem lipazy B, pochodzącej ze szczepu *Candida antarctica* jako katalizatora. Polimeryzację przeprowadzono w roztworach eteru difenyłowego z udziałem bursztynianu dietylu i 1,4-butanediolu oraz poli(glikolu etylenowego) (PEG), wprowadzanego na różnych etapach reakcji, w temperaturze 80°C w warunkach zmiennego ciśnienia. Oceniono wpływ ciśnienia oraz sposobu wprowadzania PEGu na budowę chemiczną i właściwości termiczne otrzymanych kopolimerów (estrowo-eterów). Budowa chemiczna zsyntezowanych kopolimerów została oceniona na podstawie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR) oraz spektroskopii w podczerwieni (IR). Właściwości termiczne zbadano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC). Wykazano, że zastosowanie enzymu jako katalizatora prowadzi do otrzymania kopolimeru segmentowego, jednak reakcje przebiegają z dosyć niskimi wydajnościami oraz powstałe kopolimery wykazują małą wartość masy molowej. Stwierdzono również, że na większą wydajność reakcji oraz wzrost masy molowej wpływa jej prowadzenie w warunkach nadciśnienia niż podciśnienia.

Słowa kluczowe: kataliza enzymatyczna, lipaza, kopolimery estrowo-eterowe, poli(bursztynian butylenu), polikondensacja

[Inżynieria Biomateriałów 121 (2013) 42-48]

Wprowadzenie

Polimery biodegradowalne są najczęściej stosowanymi materiałami jako podłoża dla hodowli komórkowych metodami inżynierii tkankowej. Należą do nich głównie poliestry alifatyczne, takie jak poli(kwas mlekowy) (PLA), poli(kwas glikolowy) (PGA), poli(ε-kaprolakton) (PCL) i ich kopolimery [1]. Zazwyczaj są one syntezowane na drodze reakcji chemicznych, w których substraty (monomery) ulegają polimeryzacji w obecności różnych układów katalitycznych, głównie alkoholanów lub tlenków metali [2-5]. Niestety, wiele spośród tych układów wykazuje właściwości toksyczne [6,7], dlatego enzymy wzbudzają coraz większe zainteresowanie w ostatnich latach jako nietoksyczne i wysoce selektywne układy katalityczne.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(BUTYLENE SUCCINATE-CO-ETHYLENE GLYCOL) MULTIBLOCK COPOLYMER (PBS-EG) CATALYZED BY LIPASE B FROM CANDIDA ANTARCTICA

BOGUSŁAWA GRADZIK, MIROŚLAWA EL FRAY*

WEST POMERANIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, NANOTECHNOLOGY CENTRE, AL. PIASTÓW 45, 70-311 SZCZECIN, POLAND

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

Abstract

The paper presents studies on the synthesis of segmented copoly(ester-ether) - a poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG) using as a catalyst - lipase B derived from *Candida antarctica* strain. The polymerization was performed in the solutions of diphenyl ether, involving diethyl succinate and 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) (PEG) introduced at different stages of the reaction, at 80°C under variable pressure. The influence of variable pressure and methods of introducing PEG monomer on the chemical structure and thermal properties of resulting copoly(ester-ether) was examined. The chemical structure of synthesized copolyesters was determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) and infrared spectroscopy (IR). The thermal properties were investigated using differential scanning calorimetry (DSC). It was observed that use of enzyme as catalyst allows to obtain a segmented copolymer, however the reactions take place with relatively low yields and molar mass. It was also found that higher yield and molar mass of the reaction was observed at overpressure than at underpressure conditions.

Keywords: enzymatic polymerization, lipase, poly(ether-ester) copolymer, poly(butylene succinate), polycondensation

[Engineering of Biomaterials 121 (2013) 42-48]

Introduction

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

Enzymy należą do grupy biokatalizatorów odpowiedzialnych za przemiany metaboliczne *in vivo*, włączając syntezę biopolimerów (biomakromolekuł). W ostatnich latach, enzymy zaczęto stosować jako katalizatory w syntezie wielofunkcyjnych polimerów o dobrze zdefiniowanej strukturze. Do syntezy biodegradowalnych poliesterów stosowane są najczęściej lipazy ze względu na ich stabilność w mediach organicznych.

Poli(bursztynian butylenu) (PBS) jest alifatycznym poliestrem o dobrej wytrzymałości mechanicznej, biokompatybilności w kontakcie z komórkami osteoblastów, indukując ich namnażanie oraz różnicowanie [8]. Testy degradacji hydrolytycznej wykazały, że PBS ulega degradacji w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami w sposób analogiczny do poli(alfa-hydroksykwasów) [9], a produkty jego degradacji, m.in. fumaran, są nietoksyczne (cząsteczki bursztynianu i fumaranu są obecne w Cyklu Krebsa), dlatego materiał ten jest obiecującym kandydatem do zastosowań medycznych [8-11], szczególnie do rekonstrukcji tkanek miękkich i twardych w inżynierii tkankowej. Proces biodegradacji poliesterów można modyfikować poprzez wprowadzanie hydrofilowych segmentów, np. polieterów do łańcucha polimerowego, ponieważ homopolimer PBS wykazuje wysoki stopień krystaliczności i jest hydrofobowy. Zastosowanie polieterów jako składników segmentów giętkich w kopolimerach PBS prowadzi do utworzenia materiałów, których właściwości mechaniczne mogą być łatwo kontrolowane poprzez rodzaj, udział wagowy i długość segmentu giętkiego. Przykładowo, poli(glikol etylenowy) (PEG), znany jako nietoksyczny, nieantygenny i biozgodny substrat jest często stosowany jako składnik poprawiający właściwości hydrofilowe i biokompatybilność biomateriałów polimerowych.

Biorąc pod uwagę zalety alifatycznego poliestru, jakim jest PBS oraz hydrofilowego polieteru, PEG, a także użycie nietoksycznych enzymów jako katalizatorów, w niniejszej pracy podjęto po raz pierwszy badania nad otrzymaniem i zbadaniem właściwości tych nowych materiałów. Jak dotąd, aktywność katalityczna lipaz została sprawdzona w syntezie wysokocząsteczkowego PBS [12-17], jednakże bezpośrednia synteza z kwasu bursztynowego i 1,4-butanediolu jest trudna z powodu rozdziału fazowego reagentów. W celu uniknięcia tego problemu, używa się estrów kwasu bursztynowego, bursztynianu dietylu i 1,4-butanediolu uzyskując homogeniczną mieszaninę reakcyjną w odpowiednim rozpuszczalniku [18,19]. Polimeryzacja katalizowana lipazami wykazuje wysoką chemo-, regio- i enancjo-selektywność, co pozwala utrzymać kontrolę nad budową chemiczną i finalnymi właściwościami PBS [18].

W pracy przedstawiono syntezę segmentowych kopolimero- (estro-eterów) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-PEG), katalizowaną lipazą B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica*. Sekwencje poli(bursztynianu butylenu) (PBS) tworzą w takich układach segmenty sztywne, natomiast poli(glikolu etylenowe) (PEG) stanowią segmenty giętkie. Zbadano wpływ ciśnienia oraz sposobu wprowadzania polieteru na wydajność prowadzonych syntez, budowę chemiczną i właściwości termiczne otrzymanych materiałów.

Materiały i metody

Materiały

Kopoli(estro-etry) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego), oznaczone w pracy jako PBS-EG, otrzymano metodą polimeryzacji enzymatycznej przy użyciu bursztynianu dietylu (BDE), 1,4-butanediolu (1,4-BD) oraz poli(glikolu etylenowego) (PEG_1000) w eterze difenylowym. Jako katalizatora użyto lipazę B pochodzącą ze szczepu *Candida antarctica* o nazwie handlowej Novozym 435th (N435). Schemat syntezy przedstawiono na RYS. 1.

Poly(butylene succinate) (PBS) is a typical biodegradable aliphatic polyester with excellent mechanical properties, good biocompatibility in contact with osteoblasts inducing their proliferation and differentiation [8]. The hydrolytic degradation indicated that PBS was degrading in the solution of phosphate buffered saline and showed similar behavior to poly(alpha-hydroxy acids) [9] and its degradation products, including fumarate, are non-toxic (succinate and fumarate molecules are included in the Krebs Cycle), therefore this material is of great promise for biomedical applications [8-11], especially for soft and hard tissue engineering. The biodegradability of polyesters can be improved by increasing the hydrophilicity, such as by the introduction of hydrophilic segments, i.e. polyethers, because PBS as a homopolymer is highly crystalline and hydrophobic. The introduction of polyether soft segments into copolyesters leads to the formation of segmented polymers whose mechanical properties can be easily controlled by the type, the weight percent and the length of the soft segments. For example, poly(ethylene oxide), known as nontoxic, non-antigenic and non-immunogenic polymer, is often used as the component to impart good hydrophilicity and biocompatibility of biomaterials.

Taking the advantages of aliphatic polyester such as PBS and hydrophilic PEG polyether, and enzymes as non-toxic catalysts, we report here, for the first time, our work on the synthesis and characterization of these new materials. So far, lipase catalysis was successfully employed to synthesize high molecular weight PBS [12-17], however direct synthesis of succinic acid and 1,4-butanediol remains inefficient due to the phase separation of the reagents. To overcome this problem, monophasic reaction mixtures in the corresponding solvent were prepared from diethyl succinate and 1,4-butanediol [18,19]. The lipase-catalyzed polymerizations show very high chemo-, regio-, and enantio-selectivities what allows to keep a good control over the chemical structure and final properties of PBS [18].

In this work, we will discuss the polymerization of segmented copoly(ether-ester) poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG) catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. In such systems, the sequences of poly(butylene succinate) (PBS) form hard segments and poly(ethylene glycol) (PEG) segments are soft. In this work, we will discuss the influence of variable pressure and introducing PEG at various stages of the reaction on reaction yield, chemical structure and thermal properties of the materials.

Materials and methods

Materials

Copoly(ether-ester) of poly (butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG), abbreviated in the work as PBS-EG, was prepared by enzymatic polymerization of succinic acid ester (diethyl succinate) and 1,4-butanediol (1,4-BD) and poly(ethylene glycol) (PEG_1000), in organic solvent (diphenyl ether). Lipase B derived from *Candida antarctica* strain, trade name Novozym 435th (N435), was used as a catalyst. The schematic outline of the synthesis is presented in FIG. 1.

N435 (10% wt. catalyst based on the total weight of all reagents), dried under 0.1 mmHg vacuum at 25°C for 24 h, was transferred into a 50 mL round-bottom flask containing monomers: diethyl succinate, 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) (PEG_1000) with organic solvent - diphenyl ether (200 wt% catalyst based on the total weight of all reagents). The reaction mixture was magnetically stirred and heated at 80°C. The molar ratio of the reagents 1,4-BD:PEG:DES was 0.015:0.02 mol.

Immobilizowany enzym, Novozym N435 (10% wag. katalizatora w stosunku do masy wszystkich reagentów), wysuszony pod ciśnieniem 0,1 mmHg w temperaturze 25°C przez 24 h, przeniesiono do kolby kulistej o pojemności 50 ml zawierającej monomery: bursztynian dietylu, 1,4-butanediol oraz poli(glikol etylenowy) (PEG_1000) zawieszony w rozpuszczalniku organicznym – eterze difenylowym (200% wag. rozpuszczalnika w stosunku do masy wszystkich reagentów). Stosunek molowy reagentów 1,4-BD:PEG/DES wynosił 0.015:0.02 mol.

Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze 80°C, przy jednoczesnym mieszaniu. Reakcję prowadzono pod ciśnieniem atmosferycznym przez 2 h (I etap), następnie wytworzono podciśnienie 0,5 mmHg i reakcję prowadzono dalej przez 4 h (II etap). Otrzymany w ten sposób materiał oznaczono jako PBS-EG1. W przypadku pozostałych dwóch materiałów PBS-EG2 oraz PBS-EG3 zastosowano odpowiednio podciśnienie 0,5 mm Hg i nadciśnienie 2 mm Hg, a PEG_1000 wprowadzono dopiero na etapie polikondensacji (II etap). Udział segmentów sztywnych (W_h) do giętkich (W_s) na podstawie obliczeń stechiometrycznych wynosił 50/50% wag.

Produkty reakcji rozpuszczono w chloroformie w celu rozpuszczenia nieprzereagowanych monomerów oraz zanieczyszczeń i filtrowano w celu odmycia mikrosfer, na których był immobilizowany enzymatyczny katalizator. Roztwory polimerów w chloroformie wytrącano w metanolu w postaci białego, krystalicznego produktu. Zsyntezowane polimery przemyto jeszcze metanolem pięć razy i suszono w 50°C przez 16 h.

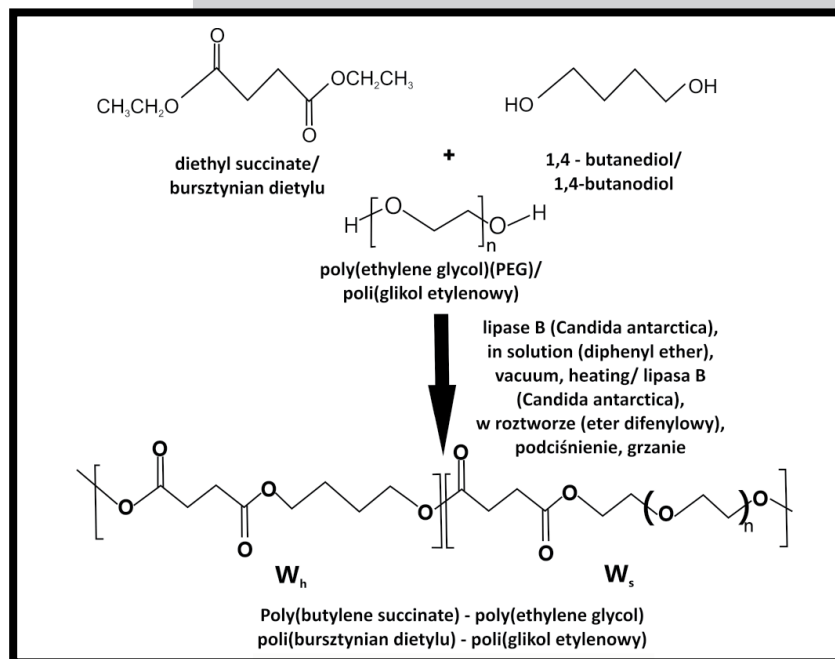
Homopolimer PBS syntezowano w analogiczny sposób, stosując warunki opisane w [20]: temperatura reakcji 80°C, ciśnienie 0,5 mmHg, czas reakcji: I etap 2 h, II etap 9 h.

Metody

Budowę chemiczną kopolimeru PBS-EG oceniono na podstawie spektrogramów magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR) przy użyciu spektrometru Bruker DPX 400 w deuterowanym chloroformie. Widma zostały wykonane przy częstotliwości 400,13 MHz (^1H NMR), stosując tetrametylosilan jako wzorzec wewnętrzny. Na podstawie przykładowego widma pokazanego na RYS. 2, porównano intensywności poszczególnych pików i wyliczono zawartość segmentów giętkich w kopolimerze oraz masy molowe, korzystając z zależności jak w pracy [21], tj. porównując intensywności pików A (reszty od estru kwasu bursztynowego w PBS) i D (grupy metylenowej od PEG połączonej z grupą karboksylową od estru kwasu bursztynowego) i odczytując ilość protonów (pod powierzchnią obydwu pików) pochodzących od estru kwasu bursztynowego (1000 p^+) i od PEGu ($1743,5\text{ p}^+$).

Do oceny budowy chemicznej kopolimeru zastosowano również spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR), stosując spektrofotometr Thermo Nicolet ze złotą przystawką w zakresie liczb falowych 4000 do 400 cm^{-1} .

Analizę termiczną otrzymanego kopolimeru wykonano metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) przy użyciu aparatu Q100 TA Instruments w cyklu: grzanie-chłodzenie-grzanie w zakresie temperatur $-100 - 250^\circ\text{C}$, przy szybkości grzania/chłodzenia 10 deg/min .



RYS. 1. Schemat syntezy poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG).

FIG. 1. Synthesis of poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG).

The reaction was carried out under atmospheric pressure for the first 2 h (I step) and then the reaction pressure was reduced to 0.5 mmHg (underpressure), respectively, with no change in the temperature and then the reaction was carried out for 4 hours (II step). Obtained material was abbreviated as PBS-EG1. In the case of the other two materials PBS-EG2 and PBS-EG3 pressure was reduced to underpressure - 0.5 and overpressure - 2 mmHg, respectively. Besides, PEG_1000 was introduced at the polycondensation stage (second stage). The hard (W_h) to soft (W_s) segments ratio based on stoichiometric calculations was 50/50 wt%.

The resulting product mixture was dissolved in chloroform to dissolve the unreacted monomers and impurities and then the microspheres in which the enzyme catalyst was immobilized were separated. The resulting chloroform solution was slowly added with stirring to methanol to precipitate a white crystalline product. The synthesized polymer was additionally washed with methanol for five times and then dried in vacuum at 50°C for 16 h.

PBS homopolymer was synthesized in an analogous way using the conditions as described in [20]: reaction temperature 80°C, pressure 0.5 mmHg, reaction time: I stage – 2 h, II stage – 9 h.

Methods

The chemical structure of the copolymer PBS-EG was determined from magnetic nuclear resonance (^1H NMR) spectrograms. Measurements were performed with a Bruker DPX 400 apparatus in deuterated chloroform, using tetramethylsilane as an internal standard. Spectra were obtained at a frequency of 400.13 MHz. Based on ^1H NMR spectra (as shown in FIG. 2), the soft segments content and molar mass in the copolymer was calculated by comparing the intensity of the individual peaks using calculations as in work [21], i.e. by comparing the intensity of peak A (residues of succinic acid ester in PBS) and peak D (PEG methylene group linked to the carboxyl group of succinic acid ester), and reading the number of protons (the area under both peaks) derived from succinic acid ester (1000 p^+), and from PEGs (1743.5 p^+).

Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji bursztynianu dietylu, 1,4-butanodiolu oraz poli(glikolu etylenowego), prowadzonej w czasie 4 h w temperaturze 80°C i w obecności enzymu jako katalizatora, otrzymano kopolimery poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) o budowie chemicznej pokazanej na spektrogramie ^1H NMR (RYS. 2).

Szczegółowa analiza spektrogramu wykazała następujące przesunięcia chemiczne: 2,66 ($\delta\text{H}^{\text{A}}$) ppm przypisano protonom pochodzącym od jednostek kwasu bursztynowego w polimerze, natomiast sygnały przy 1,72 ($\delta\text{H}^{\text{B}}$) i 4,12 ($\delta\text{H}^{\text{C}}$) ppm odpowiadają dwóm różnym rodzajom protonów grup metylenowych pochodzących od jednostek 1,4-butanodiolu. Sygnał od protonów grup metylenowych PEG jest widoczny przy 3,64 ppm ($\delta\text{H}^{\text{D}}$). Dwa sygnały przy 3,82 ($\delta\text{H}^{\text{D}'}$) oraz 4,25 ($\delta\text{H}^{\text{D}''}$) ppm przypisano do protonów grup metylenowych pochodzących od PEG związanych z jednostkami kwasu bursztynowego.

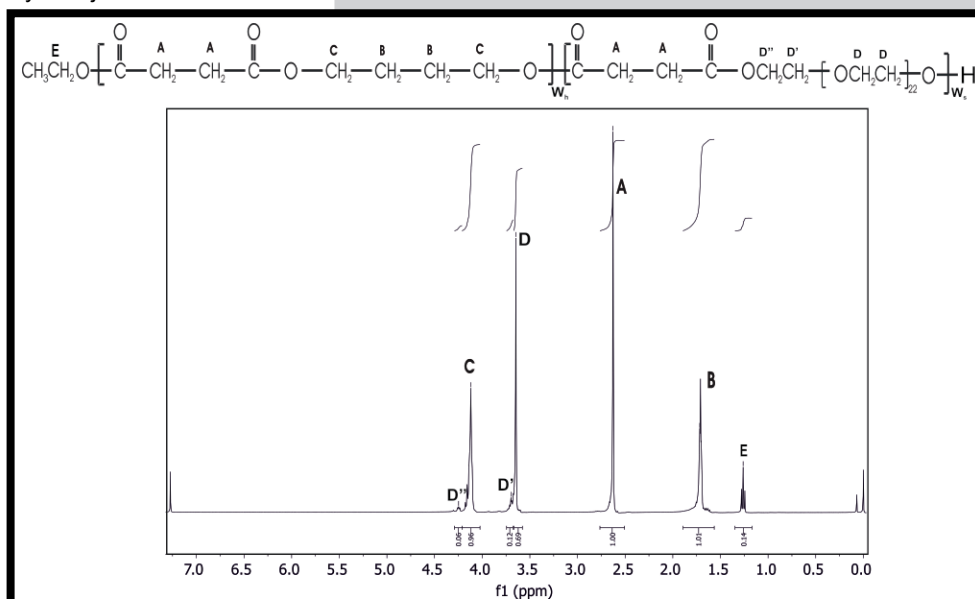
Analiza budowy chemicznej kopoliestru za pomocą ^1H NMR wykazała liniową budowę uzyskanego materiału, bez obecności struktur cyklicznych. Metoda ^1H NMR pozwoliła również na oszacowanie rzeczywistych udziałów wagowych segmentów sztywnych do giętkich, W_n/W_s (% wag.) zsyntezowanych kopolimerów. TABELA 1 zawiera obliczone wartości W_n/W_s , masy molowe (M_n) oraz wydajności reakcji (W). Wydajność reakcji obliczono jako stosunek masy produktu otrzymanego w wyniku reakcji chemicznej do masy obliczonej na podstawie współczynników stechiometrycznych równania reakcji i ilości użytych substratów.

To evaluate the chemical structure of the copolymer, fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) was also carried out with Thermo Nicolet apparatus with the Golden Gate adapter in the range between 4000 and 400 cm^{-1} .

Differential scanning calorimetry (DSC) of obtained copolymer was performed with the Q100 TA Instruments apparatus is a triple cycle: heating-cooling-heating in the range from -100 - 250°C at heating/cooling rate 10 deg/min.

Results and Discussion

Enzymatic synthesis of diethyl succinate, 1,4-butanediol and poly(ethylene glycol) carried out for 4 hours at 80°C in the presence of an enzyme as catalyst resulted in poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) copolymers of chemical structure as depicted in the formula and shown in ^1H NMR spectrogram (FIG. 2).



RYS. 2. Widmo ^1H NMR kopolimerów PBS-EG (na przykładzie PBS-EG3 otrzymanego przy nadciśnieniu 2 mmHg).

FIG. 2. ^1H NMR spectrum of PBS-EG copolymers (example of PBS-EG3 synthesized under 2 mmHg - overpressure).

TABELA 1. Udziały wagowe (W_n/W_s), masy molowe (M_n) oraz wydajności reakcji (W) dla PBS-EG otrzymanych pod różnymi ciśnieniami i przy zmianach etapów wprowadzania segmentu giętkiego; $t = \text{const}$ (2 godz. + 4 godz.).

TABLE 1. Mass fraction (W_n/W_s), molar mass (M_n) and the yield of reaction (W) for PBS-EG obtained at different pressure and with changes in introduction of soft segment, $t = \text{const}$ (2 h + 4 h).

Material	W_n/W_s [% wag.] W_n/W_s [wt%]	Masa molowa Molar mass	Ciśnienie Pressure	Wprowadzenie segmentu giętkiego (PEG) Incorporation of soft segment (PEG)	W [%]
	^1H NMR	M_n [g/mol]	P [mmHg]		
PBS-EG1	80/20	2240	0.5	I etap / step	15
PBS-EG2	81/19	2300	0.5	II etap / step	22
PBS-EG3	70/30	2660	2.0	II etap / step	30

A detailed assignment of chemical shifts is shown as follows: the signal at 2.66 ($\delta\text{H}^{\text{A}}$) ppm was assigned to the methylene proton of SA unit in the polymer, and those at 1.72 ($\delta\text{H}^{\text{B}}$) and 4.12 ($\delta\text{H}^{\text{C}}$) ppm correspond to two different types of methylene protons of BDO unit. The peaks of methylene protons of PEG repeating unit were observed at 3.64 ppm ($\delta\text{H}^{\text{D}}$). The two small peaks at 3.82 ($\delta\text{H}^{\text{D}'}$) and 4.25 ($\delta\text{H}^{\text{D}''}$) ppm were ascribed to the two methylene protons of PEG terminus linked with SA.

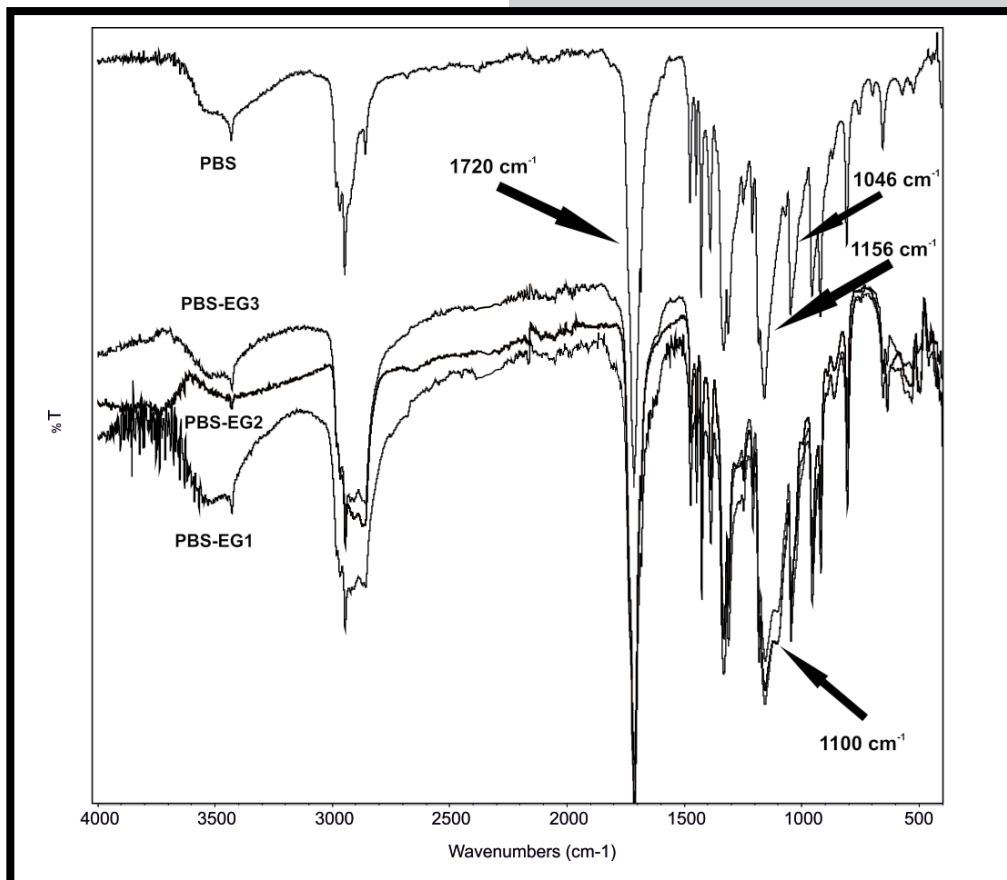
By analyzing the copolyester structure with ^1H NMR we found a linear structure without rings formation. ^1H NMR method allowed to estimate the mass fraction of hard segments to soft segments, W_n/W_s [wt%] and molar mass in the synthesized materials. TABLE 1 shows the calculated values of W_n/W_s , molar mass (M_n) and the yield (W) of the reaction. The reaction yield was calculated as the ratio of the product weight obtained during chemical reaction to the stoichiometric weight of the reagents.

Na podstawie obliczeń składu chemicznego na podstawie widm ^1H NMR stwierdzono, że w zastosowanych warunkach reakcji (całkowity czas reakcji 6 godzin i zmienne warunki ciśnienia), uzyskane produkty znacząco różnią się składem segmentowym w porównaniu do założonego na podstawie stechiometrii reakcji (50:50% wag). Najwyższą zawartość segmentów giętkich, jednak tylko 30%, wartość masy molowej (2660 g/mol) oraz wydajność reakcji na poziomie 30% uzyskano dla materiału PBS-EG3, który zsyntezowano przy ciśnieniu 2,0 mmHg. Przy znacznie obniżonym ciśnieniu, tj. 0,5 mmHg oraz podczas wprowadzenia PEG w czasie I etapu syntezy (PBS-EG1), stwierdzono niższy udział segmentów giętkich (20%), niższą masę molową (2240 g/mol) i niższą wydajność reakcji (tylko 15%). W przypadku materiału PBS-EG2 i przy zachowaniu analogicznych warunków ciśnienia jak w syntezie materiału PBS-EG1, ale przy wprowadzeniu PEG_1000 podczas drugiego etapu reakcji, obliczona wydajność reakcji wynosiła 22%, jednak zawartość segmentów giętkich wynosiła tylko 19%, a wartość masy molowej była zbliżona do tej uzyskanej dla materiału PBS-EG1. Wstępna analiza tych wyników wskazuje, że istotnym parametrem wpływającym na wydajność reakcji jest ciśnienie procesu. Jednak należy zwrócić uwagę, że reakcje prowadzono w stosunkowo krótkim czasie: 2 godz. I etap i 4 godz. II etap. Jak wynika z literatury, prowadzenie reakcji syntezy homopolimeru PBS przez 10 h prowadzi do powstania produktu o $M_n = 5500$ Da, natomiast po 72 h uzyskuje się produkt o $M_n = 10\,000$ Da [22-25]. Dlatego też kolejne syntezy należy prowadzić przy znacząco wydłużonych czasach reakcji, aby uzyskać kopolimer o wyższej masie molowej, zakładanym udziale segmentów sztywnych do giętkich, i wysokim stopniu przereagowania.

Budowę chemiczną zsyntezowanych materiałów oceniono również na podstawie widm ATR FT-IR (RYS. 3).

Based on calculations of the chemical composition of the ^1H NMR spectra it was found that the reaction conditions used (total reaction time was 6 hours and variable pressure conditions), the products obtained are significantly different in composition compared to the segment based on the assumed stoichiometry of the reaction (50:50 wt%). The highest content of soft segments, but only 30%, molar mass (2660 g/mol) and the reaction yield of 30% were obtained for PBS-EG3 material, which was synthesized at pressure 2.0 mmHg. At much lower pressure, i.e. 0.5 mmHg, and when PEG segments were introduced during the first step of the synthesis (PBS-EG1), lower content of soft segments (20%), molar mass (2240 g/mol) and lower yield of the reaction (only 15%) was found. In the case of PBS-EG2 material when maintaining similar pressure conditions as in the synthesis of PBS-EG1, but with the introduction of PEG_1000 during the second step of reaction, the calculated reaction yield was found to be 22%, but the content of soft segments was only 19% and molar mass was similar to PBS-EG1 material. Preliminary analysis of these results indicates that an important parameter affecting the yield of the reaction is applied pressure. However, it should be noted that the reactions were carried out in a relatively short period of time: 2 h (I step) and 4 h (II step). According to the literature, the first 10 h of the reaction are necessary for rapid increase in M_n up to 5500 Da. Thereafter, M_n can increase to 8000 and 10 000 by 24 and 72 h, respectively [22-25]. Therefore, next synthesis will be carried out at significantly prolonged reaction time to obtain copolymers with higher molar mass, hard to soft segments content close to stoichiometry and with high conversion.

The chemical structure of synthesized materials was also confirmed with the infrared spectroscopy (ATR-FTIR) (FIG. 3).



RYS. 3. Widma ATR FT-IR dla uzyskanych materiałów PBS-EG.
FIG. 3. ATR FT-IR spectra for obtained materials of PBS-EG.

Charakterystyczne pasma absorpcji dla widma homopolimeru PBS zaobserwowano przy długości fali 1720 cm^{-1} , 1156 cm^{-1} oraz 1046 cm^{-1} (drgania rozciągające od alifatycznych wiązań C=O). W widmach kopolimerów pojawiają się pasma charakterystyczne dla grup eterowych, w tym pochodzące od wiązań C-O-C przy długości fali 1100 cm^{-1} .

Właściwości termiczne materiałów oznaczono na podstawie termogramów DSC, a uzyskane wartości temperatur topnienia T_m , temperatur krystalizacji T_c oraz odpowiadające im entalpie zestawiono w TABELI 2. W tabeli przedstawiono również właściwości termiczne homopolimeru PBS zsyntezowanego przy zastosowaniu katalizatora enzymatycznego (PBS enz.).

Materiały PBS-EG wykazują niskotemperaturową przemianę zeszklenia, T_g (ok. -50°C) oraz temperaturę topnienia, T_m (ok. $94-98^\circ\text{C}$), co świadczy o utworzeniu się kopolimeru, gdyż niskotemperaturowe zeszklenie można przypisać segmentom giętkim PEG, natomiast T_m dotyczy segmentów sztywnych PBS (niskotemperaturowego T_g nie zaobserwowano dla homopolimeru PBS enz.). Otrzymane wartości T_m dla kopolimerów są niższe niż T_m dla PBS enz., niższe są również wartości temperatur krystalizacji, T_c , gdyż wprowadzenie oligoeteru zaburza strukturę krystaliczną poli(bursztynianu butylenu). Dla kopolimeru PBS-EG3 stwierdzono najniższą wartość zmiany ciepła właściwego oraz najniższą wartość entalpii topnienia, ΔH_m i entalpii krystalizacji, ΔH_c , co może świadczyć o dobrej mikro-separacji fazowej tego materiału (dokładna weryfikacja tego twierdzenia wymagałaby dodatkowych badań metodą WAXS).

TABELA 2. Charakterystyka właściwości termicznych dla uzyskanych materiałów PBS-EG.

TABLE 2. Characteristic thermal behavior for synthesized PBS-EG materials.

Numer próbki Sample code	T_m [$^\circ\text{C}$]	ΔH_m [J/g]	T_c [$^\circ\text{C}$]	ΔH_c [J/g]	T_g [$^\circ\text{C}$]	ΔC_p [J/(g $^\circ\text{C}$)]
PBS-EG1	94.8	96.4	52.5	80.9	-51.3	0.374
PBS-EG2	97.5	83.9	56.2	69.3	-48.7	0.363
PBS-EG3	98.6	37.9	50.7	28.3	-48.8	0.309
PBS enz.	108.8	123.0	71.2	93.0	-	-

where:

T_m - temperatura topnienia / melting temperature (drugi cykl ogrzewania / 2nd heating run),
 ΔH_m - entalpia topnienia / melting enthalpy,
 T_c - temperatura krystalizacji / crystallization temperature,
 ΔH_c - entalpia krystalizacji / crystallization enthalpy,
 ΔC_p - zmiana ciepła właściwego / change in heat capacity

We can see the characteristic absorption bands of PBS appeared at 1720 cm^{-1} (stretching vibration of aliphatic C\O bond), 1156 cm^{-1} , and 1046 cm^{-1} (stretching vibration of aliphatic C\O bond). In the following spectra for PBS-EG the characteristic absorption bands of PBS were noticed, at same time, the aliphatic C\O\C stretching vibration peak of PEG that appeared at 1100 cm^{-1} was found.

The characteristic thermal properties were determined from DSC scans, and high temperature melting peak, T_m and the crystallization temperature, T_c , and the corresponding enthalpies are summarized in TABLE 2. The table shows also thermal properties for the homopolymer PBS synthesized using an enzyme catalyst (PBS enz.).

PBS-EG materials exhibit low-temperature glass transition, T_g (ca. -50°C) and the melting temperature T_m (approximately $94-98^\circ\text{C}$), which indicates formation of copolymer, because low-temperature glass transition can be attributed to the soft segments (PEG), and T_m to the hard segments PBS (low temperature T_g was not observed for the homopolymer PBS enz.). T_m values obtained for the copolymers are lower than the T_m for the PBS enz., and also we can see lower crystallization temperatures, T_c . For the PBS-EG3 copolymer, the lowest value of heat capacity changes and the lowest value of the melting enthalpy, ΔH_m and crystallization enthalpy, ΔH_c , were found what may indicate good microphase separation of the material (verification of this statement would require additional measurements with WAXS).

Wnioski

Stosując immobilizowany enzym jako katalizator otrzymano kopolimery poli(estro-etry) poli(bursztynianu butylenu-co-glikolu etylenowego) (PBS-EG) w warunkach różnych ciśnień oraz wprowadzając PEG na różnych etapach syntezy. Analiza budowy chemicznej metodami ^1H NMR i ATR FT-IR potwierdziła obecność ugrupowań charakterystycznych dla grup estrowych i eterowych pochodzących od sekwencji PBS i PEG. Wykazano, że zastosowane wartości podciśnienia lub nadciśnienia na etapie polikondensacji wpływają na wydajność reakcji, która wynosiła najwyżej 30%. Warunki te miały również wpływ na stopień wbudowania się oligoeterowych segmentów giętkich w strukturę makrocząsteczki, który wynosił maksymalnie 30% (w odniesieniu do wyliczonych na podstawie stechiometrii 50% wag.) oraz wartości masy molowej, wynoszącej maksymalnie 2660 g/mol. Analiza właściwości termicznych wykazała przesunięcie temperatury krystalizacji, T_c i temperatury topnienia, T_m w kierunku niższych wartości w porównaniu do homopolimeru PBS, świadcząc o utworzeniu się segmentowego kopolimeru i zaburzeniu struktury krystalicznej poli(bursztynianu butylenu).

Conclusions

We have synthesized copoly(ether-ester), namely poly(butylene succinate-co-ethylene glycol) (PBS-EG), using immobilized enzyme as a catalyst and different pressure, and introducing PEG at various steps of the reaction. Analysis of chemical structure with ^1H NMR and ATR FT-IR confirmed the presence of specific bonds and groups, characteristic for ester and ether groups, derived from the sequences of PBS and PEG. It has been shown, that the applied underpressure or overpressure at the polycondensation step, influence the reaction yield, which is no higher than 30%. These conditions also affected the degree of incorporation of the oligoethers soft segments to macromolecule structure, which was maximum 30% (compare to 50 wt.% calculated from the stoichiometry) and molar mass, which the highest value was 2660 g/mol. Analysis of characteristic thermal properties showed that thermal shifts of crystallization temperature, T_c , and the melting temperature T_m , had lower values as compared to the homopolymer PBS, providing the formation of segmented structure of the copolymer and disorder of the crystal structure of poly(butylene succinate).

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

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

Piśmiennictwo

- [1] Taylor M.S., Daniels A.U., Andriano K.P., Heller J.: Six bioabsorbable polymers: In vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *Journal of Applied Biomaterials* 5, 2 (1994) 151-157.
- [2] Oviatt T.M., Coates G.W.: Stereochemistry of Lactide Polymerization with Chiral Catalysts: New Opportunities for Stereocontrol Using Polymer Exchange Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 7 (2002) 1316-1326.
- [3] Davis R.J., Liu Z.: Titania-silica: a model binary oxide catalyst system. *Chem. Mater.* 9, 11 (1997) 2311-2324.
- [4] Kim Y., Verkade J.G.: Living Polymerization of Lactide Using Titanium Alkoxide Catalysts, *Macromolecular Symposia Special Issue: Bio-Based Polymers: Recent Progress* 224, 1 (2005) 105-118.
- [5] Jacquel N., Freyermouth F., Fenouillot F., Rousseau A., Pascault J.P., Fuertes P., Saint-Loup R.: Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 49, 24 (2011) 5301-5312.
- [6] Stohs S.J., Bagchi D.: Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology & Medicine* 18, 2 (1995) 321-336.
- [7] Anderson J.M.: Biological responses to materials. *Annu. Rev. Mater. Res.* 31 (2001) 81-110.
- [8] Li H., Chang J., Cao A., Wang J.: In vitro Evaluation of Biodegradable Poly(butylene succinate) as a Novel Biomaterial, *Macromolecular Bioscience* 5, 5 (2005) 433-440.
- [9] Xu J., Guo B.-H.: Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate) and Applications. *Microbiology Monographs* 14 (2010) 347-388.
- [10] Wang H., Ji J., Zhang W., Zhang Y., Jiang J., Wu Z., Pu S.: Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly(butylene succinate). *Acta Biomaterialia* 5, 1 (2009) 279-287.
- [11] Xu J., Guo H.-B.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1149-1163.
- [12] Kobayashi S., Makino A.: Enzymatic Polymer Synthesis: An Opportunity for Green Polymer Chemistry. *Chem. Rev.* 109 (2009) 5288-5353.
- [13] Mahapatro A., Kalra B., Kumar A., Gross R. A.: Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure, *Biomacromolecules* 4 (2003) 544-551.

References

- [14] Akkara J.A., Ayyagari M.S.R., Bruno F.F.: Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents, *TIBTECH FEBRUARY*, 17 (1999).
- [15] Uyama H., Kobayashi S.: Enzymatic Synthesis of Polyesters via Polycondensation. *Advances in Polymer Science* 194 (2006) 133-158.
- [16] Puskas J.E., Sen M.Y., Seo K.S.: Green Polymer Chemistry Using Nature's Catalysts, *Enzymes. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 47 (2009) 2959-2976.
- [17] Kobayashi S.: Lipase-catalyzed polyester synthesis - A green polymer chemistry. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 86 (2010)
- [18] Linko Y.-Y., Wang Z., Seppälä J.: Lipase-Catalyzed Synthesis of Poly(1,4-Butanediol Succinate) in Organic Solvent, *Biocatalysis* 8, 4 (1994) 269-282.
- [19] Binns F., Harffey P., Roberts S.M., Taylor A.: Studies of lipase-catalyzed polyesterification of an unactivated diacid/diol system. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 36, 12 (1998) 2069-2079.
- [20] El Fray M., Gradzik B.: Synteza enzymatyczna poli(bursztynianu butylenu) (PBS) katalizowana Lipazą B ze szczepu *Candida antarctica*: nowy obiecujący materiał dla zastosowań biomedycznych. *Inżynieria Biomateriałów* 115 (2012) 26-31/
- [21] El Fray M., Skrobot J., Bolikal D., Kohn J.: Synthesis and characterization of telechelic macromers containing fatty acid derivatives. *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 781-790.
- [22] Azim H., Dekhterman A., Jiang Z., Gross R. A.: *Candida antarctica* Lipase B-Catalyzed Synthesis of Poly(butylene succinate): Shorter Chain Building Blocks Also Work. *Biomacromolecules* 7 (2006) 3093-3097.
- [23] Sugihara S., Toshima K., Matsumura S.: New Strategy for Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) via Cyclic Oligomers. *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 203-207.
- [24] Mahapatro A., Kalra B., Kumar A., Gross A.: Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure. *Biomacromolecules* 4 (2003) 544-551.
- [25] Xu J., Guo B.-H.: Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization. *Biotechnology Journal* 5, 11 (2010) 1149-1163.



.....

STUDIA PODYPLOMOWE
Biomateriały – Materiały dla Medycyny
2014/2015

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 501 tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik: Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny/
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Studenci zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów, a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2014 do 20.10.2014 (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) dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
Czas trwania: 2 semestry (od XI 2014 r. do VI 2015 r.)	Opłaty: 2 600 zł
Informacje dodatkowe: Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.	

