

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

I N Ż Y N I E R I A B I O M A T E R I A Ł Ó W

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 125

Numer 125

Volume XVII

Rok XVII

APRIL 2014

KWIECIEŃ 2014

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

Górnictwo-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

Issue: 250 copies

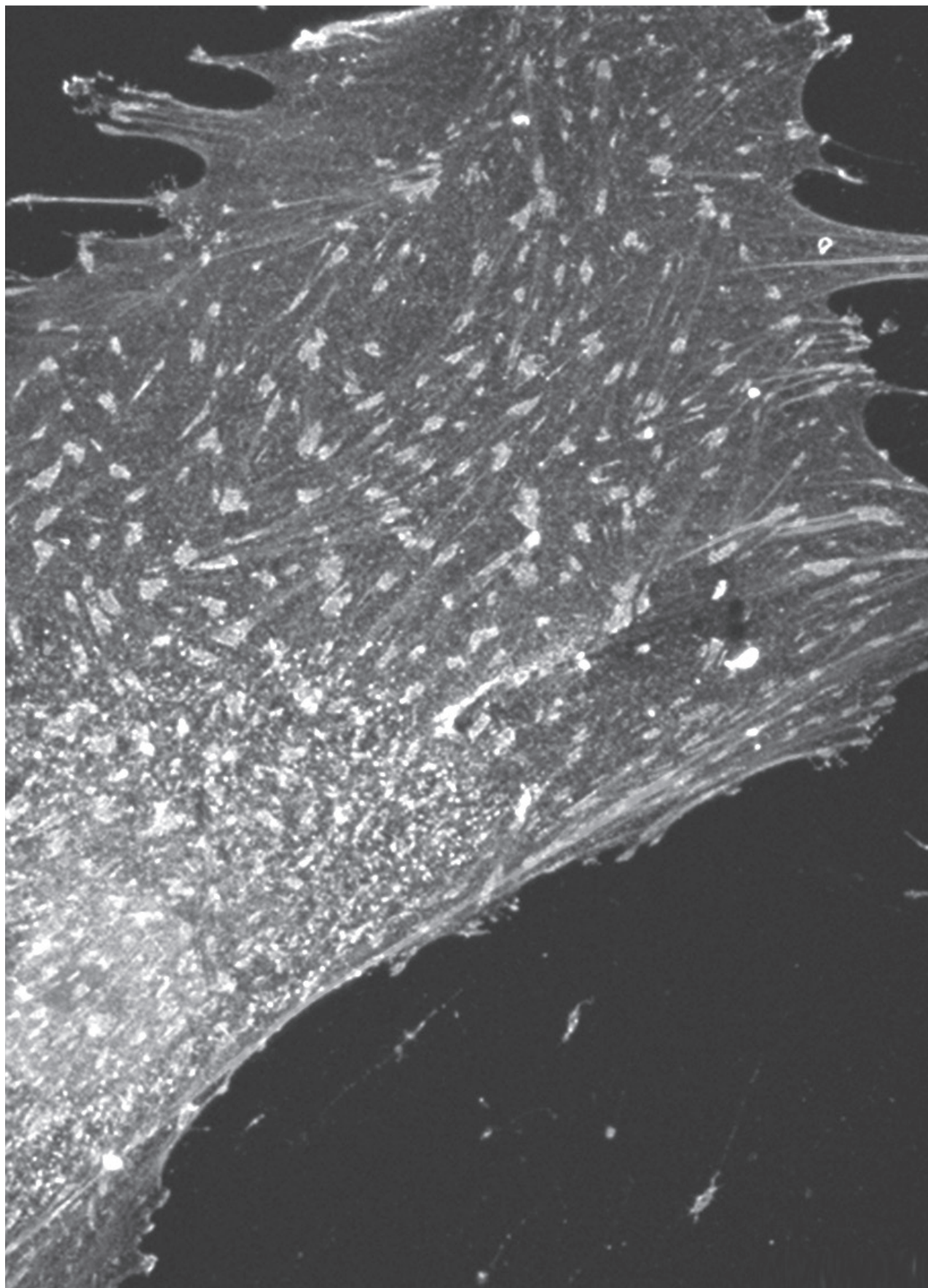
Nakład: 250 egz.

**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 Eppe - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

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. Obcojęzyczność 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

SURFACE MODIFICATIONS OF CLINICALLY USED METALLIC IMPLANTS FOR ENHANCING THEIR BIOCOMPATIBILITY AND BIOACTIVITY – A REVIEW LUCIE BACAKOVA, JANA LISKOVA, LUBICA STANKOVA, ALEXANDER KROMKA	2
WSPOMAGANIE WZROSTU KOMÓREK KOSTNYCH NA HYDROŻELACH Z GUMY GELLAN ZA POMOCĄ MINERALIZACJI ENZYMATYCZNEJ KRZYSZTOF PIETRYGA, JOANA COSTA, PEDRO PEREIRA, TIMOTHY E.L. DOUGLAS, ELŻBIETA PAMUŁA	6
ANALIZA BIOMECHANICZNA WKŁADU KORONOWO-KORZENIOWEGO Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH SONIA LOSKA, ZBIGNIEW PASZENDA, MARCIN BASIAGA, ANNA ZIĘBOWICZ, MARTA KIEL-JAMROZIK	13
ELEKTROCHEMICZNA DETEKcja INTERLEUKINY-6 NA PODŁOŻU NANOTUBULARNYM DITLENKU TYTANU KATARZYNA ARKUSZ, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK	21
BIOWCHŁANIALNE PŁYTKI ZESPALAJĄCE DLA WETERYNARII BARBARA SZARANIEC, KAROL GRYŃ, TOMASZ SZPONDER, BEATA ŻYLIŃSKA	30

CONTENTS

SURFACE MODIFICATIONS OF CLINICALLY USED METALLIC IMPLANTS FOR ENHANCING THEIR BIOCOMPATIBILITY AND BIOACTIVITY – A REVIEW LUCIE BACAKOVA, JANA LISKOVA, LUBICA STANKOVA, ALEXANDER KROMKA	2
PROMOTION OF BONE CELLS GROWTH ON GELLAN GUM HYDROGELS BY ENZYMATIC MINERALIZATION KRZYSZTOF PIETRYGA, JOANA COSTA, PEDRO PEREIRA, TIMOTHY E.L. DOUGLAS, ELŻBIETA PAMUŁA	6
BIOMECHANICAL ANALYSIS OF DENTAL POST-AND-CORE USING FINITE ELEMENT METHOD SONIA LOSKA, ZBIGNIEW PASZENDA, MARCIN BASIAGA, ANNA ZIĘBOWICZ, MARTA KIEL-JAMROZIK	13
ELECTROCHEMICAL DETECTION METHOD FOR INTERLEUKIN-6 ON TITANIA NANOTUBE PLATFORMS KATARZYNA ARKUSZ, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK	21
BIODEGRADABLE FIXATION PLATES FOR VETERINARY MEDICINE BARBARA SZARANIEC, KAROL GRYŃ, TOMASZ SZPONDER, BEATA ŻYLIŃSKA	30

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

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

SURFACE MODIFICATIONS OF CLINICALLY USED METALLIC IMPLANTS FOR ENHANCING THEIR BIOCOMPATIBILITY AND BIOACTIVITY – A REVIEW

LUCIE BACAKOVA¹, JANA LISKOVA¹, LUBICA STANKOVA¹,
ALEXANDER KROMKA²

¹ INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,
VIDENSKA 1083, 14220 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

² INSTITUTE OF PHYSICS,
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC,
CUKROVARNICKA 10, 162 00 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

[*Engineering of Biomaterials* 125 (2014) 2-5]

In hard tissue surgery, i.e. orthopaedics, traumatology, cranial, maxillofacial and dental surgery, metallic material for construction of bone implants cannot be avoided, because these implants are often exposed to a high load and mechanical stress. Ceramic materials are usually too brittle for these applications, and polymers are too elastic, unless they are reinforced with metallic, ceramic or carbon components [1-3]. Thus, the number of operations requiring metallic implants is continuously increasing. It is often desirable if the bone-contacting surface of the implant enables tight conjunction of the implant with the surrounding bone. In other words, the implant should have the primary and secondary stability. The primary stability is determined mainly by the shape of the implant and the quality of the bone preparation, but its duration is limited to several weeks or months. For example, in hip endoprostheses, the primary stability is limited to 3 months. The secondary stability comes after the primary stability, and is due by the bone tissue ingrowth into the surface structure of the implant. Therefore, the secondary stability strongly depends on the surface properties of the endoprosthesis. If a high secondary stability is achieved, a good and painless function and durability of an implant can be expected, completely without or with considerably delayed revision surgery and need of reimplantation.

In order to obtain the secondary stability of bone implants, i.e. its integration with the surrounding bone tissue, many surface treatments have been experimentally developed (with participating of our group), such as grinding, polishing [4], electric discharge machining, shot peening, acid etching [5-7], oxidation procedures [8,9], or ion implantation [10]. Some of these modifications have been also introduced into clinical practice (mostly for dental implants), e.g. electric discharge machining [11], acid etching alone [12] or in combination with sandblasting [13], microarc oxidation [14] and CO ion implantation [15].

Although some of the mentioned modifications, e.g. polishing, electric discharge machining or sandblasting, strengthened the material surface, these modifications, which are mostly referred as subtractive, i.e. degrading or reducing the material surface layer, are not able to fully prevent the release of cytotoxic ions and wear particles from the bulk material of the bone implant. Clinically used metallic bone implants are usually made of Ti (mainly stomatologic implants [11,13]), Ti-6Al-4V alloy (total hip arthroplasty [16], craniomaxillofacial surgery [17]), Co-Cr-Mo alloys [18,19] and stainless steel [20]. When exposed to load and corrosive biological environments, these materials can release cytotoxic and immunogenic ions, which can damage the adjacent and remote tissues and thus cause the implant failure or systemic diseases (e.g. neurodegenerative diseases caused by Al, carcinogenicity of Cr). These ions have been detected in the blood of patients with bone implants [18,19]. Even titanium, which is generally considered as highly biocompatible metal, caused allergy in stomatologic and other patients [21].

The release of ions and wear particles from the bone implants could be effectively prevented by a strong, continuous, non-permeable and biocompatible coating, well-adhering to the bulk material. Clinically used coatings include e.g. zirconium [18], hydroxyapatite [22], bioactive glass [23], apatite-wollastonite-containing ceramics [24], titanium dioxide [25], or biphosphonate coating [26]. Other promising coatings are nanocrystalline diamond (NCD) films developed in our earlier studies [27-30].

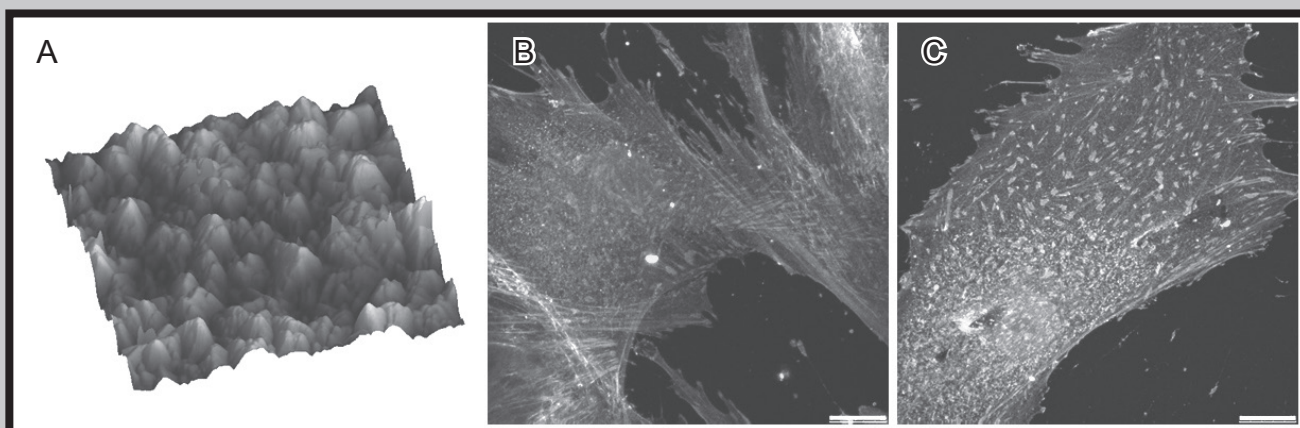


FIG. 1. Morphology of a nanocrystalline diamond film (NCD) evaluated by atomic force microscopy (AFM), picture 1 x 1 μm (A), and the adhesion of primary human osteoblasts on H-terminated (B) and O-terminated (C) NCD films. The cells were stained for talin (green, immunofluorescence), actin (red, phalloidin/TRITC), and DNA (blue, DAPI). Scale bar = 25 μm.

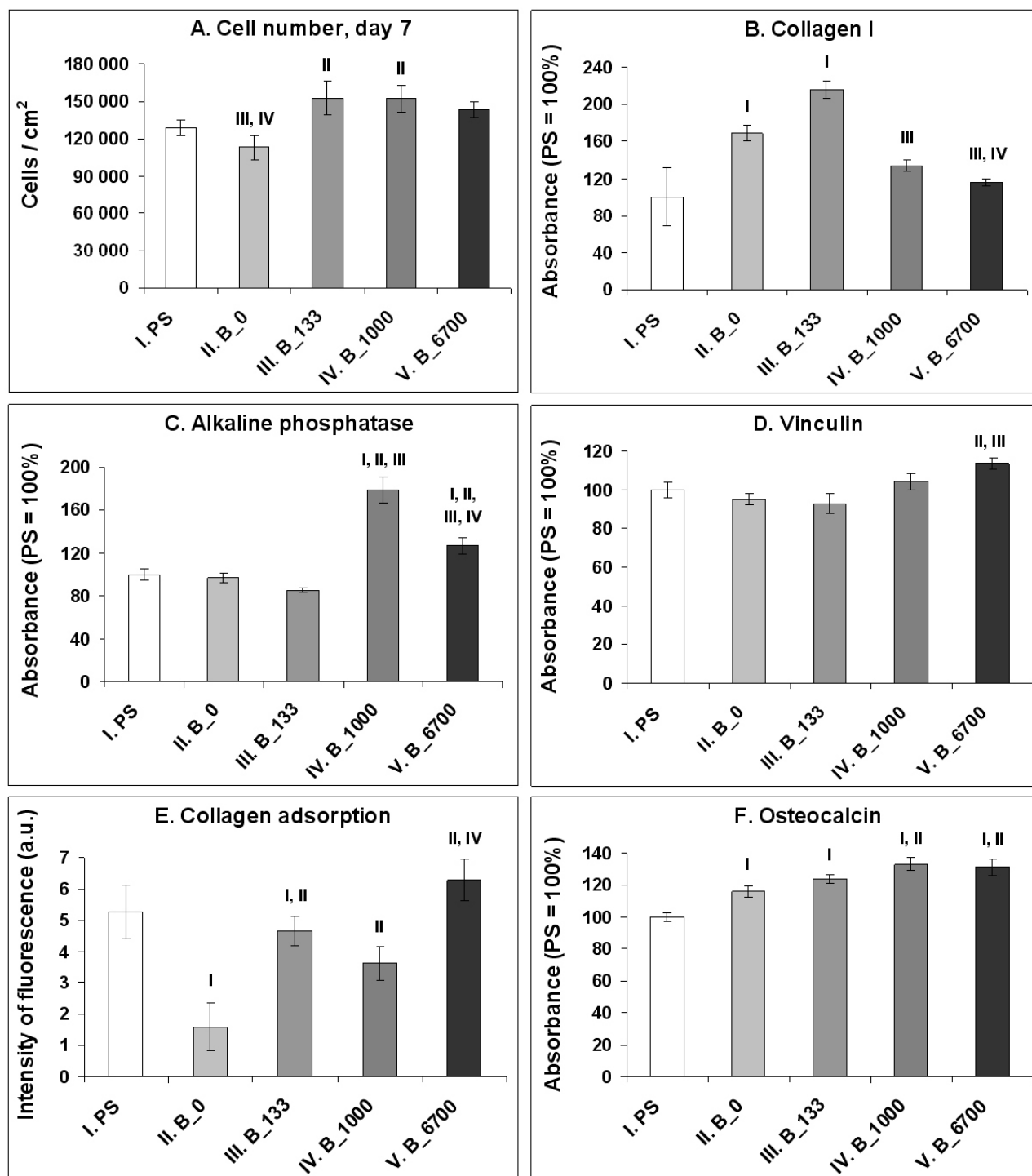


FIG. 2. Number of human osteoblast-like MG-63 cells (A), concentration of early markers of osteogenic cell differentiation collagen I (B) and alkaline phosphatase (C), concentration of integrin-associated focal adhesion protein vinculin (D), adsorption of collagen I, conjugated with Texas Red C₂-Maleimide, on the tested materials after 2 h at room temperature (E) and concentration of osteocalcin, a marker of late osteogenic differentiation (F) in MG-63 cells on day 7 after seeding on polystyrene culture dishes (PS), pure NCD films (NCD_0) and NCD films with B:C ratio of 133, 1000 or 6700 ppm (B_133, B_1000 and B_6700, respectively). Mean $\pm$ S.E.M. from 3 experiments. ANOVA, Student-Newman-Keuls Method. Statistical significance: I, II, III, IV: $p \leq 0.05$ compared to the group labeled with the same Roman number.

In general, nanostructured substrates are considered as extraordinary suitable cell carriers for implantology and tissue engineering. The nanoscale irregularities on their surface mimic the nanoarchitecture of the native extracellular matrix (ECM) molecules, e.g. nano-sized irregularities in these molecules, e.g. folded (wavy) or helical structure, branching etc. Nanoscale irregularities enlarge the surface area of a material and also increase its wettability. On nanorough surfaces, the cell adhesion-mediating ECM molecules, such as vitronectin, fibronectin, collagen or laminin, are spontaneously adsorbed in a bioactive geometrical conformation, which allow binding between specific sites in these molecules, e.g. RGD-containing amino acid sequences, and cell adhesion receptors. In addition, it is believed that among the cell adhesion-mediating molecules, nanorough surfaces adsorb preferentially vitronectin (due to its relatively small and linear molecules), which is recognized preferentially by osteoblasts through the amino acid sequence KRSR, specific for osteoblast binding [31-34]. Thus, the nanostructured surfaces are much more suitable for bone implants and bone tissue engineering than conventional flat or microstructured substrates.

In accordance with these ideas, in our earlier studies conducted *in vitro*, as well as in studies by other authors, the NCD films proved as excellent substrates supporting the adhesion, growth, viability and metabolic activity of human osteoblast-like cell MG-63 and Saos-2 cells [27-30], and also their osteogenic differentiation, as indicated by an increased activity of alkaline phosphatase [35,36], production of osteocalcin, i.e. an ECM glycoprotein binding calcium [30], and ECM mineralization [36]. The biocompatibility and bioactivity of NCD can be further enhanced by its termination with specific atoms and chemical functional groups, e.g. oxygen, which increases the material surface wettability, and thus the adsorption of cell adhesion-mediating molecules and cell colonization [37,38]. In our experiments, the O-terminated NCD coatings promoted the proliferation, synthesis of collagen I, and calcium deposition in human osteoblast-like Saos-2 cells. Primary human osteoblasts showed better developed talin-containing focal adhesion plaques and actin cytoskeleton on O-terminated than on H-terminated NCD films (FIG. 1).

The oxygen termination can be further utilized for immobilization of biologically active molecules promoting bone tissue formation, such as bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). Primary human bone marrow mesenchymal stromal cells cultured on these substrates strongly activated the expression of osteogenic markers, and when inserted into sheep calvaria, the implant showed enhanced osseointegration [39]. Osteogenic cell differentiation can be also supported by BMP-7, which is approved for clinical use in the Czech Republic in the form of commercially available preparation Osigraft [40,41].

Another possibility how to increase the NCD bioactivity is doping the NCD with boron. Boron induces electrical conductivity of NCD films, and thus enables electrical stimulation of osteoblasts, which accelerates osteogenic cell differentiation, and finally integration of the implant into the bone [42,43]. In our experiments, boron-doped NCD films were prepared with the B:C ratio of 133, 1000 and 6700 ppm. The NCD films doped with the low and medium B:C ratio (i.e., 133 and 1000 ppm of B) showed the most pronounced increase in the number of human osteoblast-like MG-63 cells in 7-day-old cultures. As measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) per mg of total protein, the cells on NCD with the B:C ratio of 133 and 1000 ppm also contained the highest concentrations of collagen I and alkaline phosphatase, respectively. On the NCD films with the B:C ratio of 6700 ppm, the cells contained the highest concentration of focal adhesion protein vinculin, and the highest amount of collagen I was adsorbed. The concentration of osteocalcin also increased with increasing level of boron doping (FIG. 2).

In addition, due to their strength, continuity, mechanical resistance and chemical stability, the NCD films could prevent the release of harmful ions from metallic implants. In our studies, the NCD films coated hermetically silicon substrates and fully prevented their cytotoxicity *in vitro*, which was clearly apparent in bare Si substrates [28].

Thus, it is of worth to test the NCD films in preclinical studies on laboratory animals and to introduce in future these coating into clinical practice, at least in the case of stomatological and other small implants (due to a still relatively high cost of these coatings).

Acknowledgement

Supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (grant No. NT13297-4/2012) and the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 14-04790S).

References

- [1] Parizek M, Douglas TEL, Novotna K, Kromka A, Brady MA, Renzing A, Voss E, Jarosova M, Palatinus L, Tesarek P, Ryparova P, Lisa V, dos Santos AM, Bacakova L: *Int J Nanomed* 7: 1931-1951 (2012).
- [2] Brady MA, Renzing A, Douglas TEL, Liu Q, Wille S, Parizek M, Bacakova L, Kromka A, Jarosova M, Godier G, Warnke PH: *J Nanosci Nanotechnol* 14: 1-10 (2014) in press
- [3] Novotna K, Zajdlova M, Suchy T, Hadraba D, Lopot F, Zaloudkova M, Douglas TE, Munzarova M, Juklickova M, Stranska D, Kubies D, Schaubroeck D, Wille S, Balcaen L, Jarosova M, Kozak H, Kromka A, Svindrych Z, Lisa V, Balik K, Bacakova L: *J Biomed Mater Res A*, (2013) in press, doi: 10.1002/jbm.a.35061
- [4] Bacakova L, Stary V, Kofronová O, Lisa V: *J Biomed Mater Res* 54: 567-578 (2001).
- [5] Harcuba P, Bacakova L, Strasky J, Bacakova M, Novotna K, Janecek M: *J Mech Behav Biomed Mater* 7: 96-105 (2012).
- [6] Strasky J, Havliková J, Bacakova L, Harcuba P, Mhaede M, Janecek M: *Appl Surf Sci* 213: 73-78 (2013).
- [7] Havlikova J, Strasky J, Vandrovцова M, Harcuba P, Mhaede M, Janecek M, Bacakova L: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 39: 371-379 (2014).
- [8] Jirka I, Vandrovцова M, Frank O, Tolde Z, Plsek J, Luxbacher T, Bacakova L, Stary V: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33: 1636-1645 (2013).
- [9] Vandrovцова M, Jirka I, Novotna K, Lisa V, Frank O, Kolska Z, Stary V, Bacakova L: *PLOS ONE* 9(6):e100475 (2014).
- [10] De Maeztu MA, Alava J, Gay-Escoda C: *Clin Oral Implants Res* 14: 57-62 (2003).
- [11] Acocella A, Ercoli C, Geminiani A, Feng C, Billi M, Acocella G, Giannini D, Sacco R: *Clin Implant Dent Relat Res* 14 (Suppl 1): e98-108 (2012).
- [12] Sesma N, Pannuti C, Cardaropoli G: *Int J Oral Maxillofac Implants* 27:1243-1248 (2012).
- [13] Walker SS, Kontogiorgos ED, Dechow PC, Kerns DG, Nelson CJ, Opperman LA: *Int J Oral Maxillofac Implants* 27: 1069-1080 (2012).
- [14] Pang KM, Lee JW, Lee JY, Lee JB, Kim SM, Kim MJ, Lee JH: *Clin Oral Implants Res* 25: 616-621 (2014).
- [15] De Maeztu MA, Braceras I, Álava JI, Recio C, Piñera M, Gay-Escoda C: *Int J Oral Maxillofac Surg* 42: 891-896 (2013).
- [16] Cho JH, Garino JP, Choo SK, Han KY, Kim JH, Oh HK: *Clin Orthop Surg* 2: 214-220 (2010).
- [17] Dérand P, Rännar LE, Hirsch JM: *Craniomaxillofac Trauma Reconstr* 5: 137-144 (2012).
- [18] Lützner J, Dinnebie G, Hartmann A, Günther KP, Kirschner S: *BMC Musculoskelet Disord* 10: 128 (2009).
- [19] Balagna C, Faga MG, Spriano S: *J Nanosci Nanotechnol* 11: 8994-9002 (2011).
- [20] So S, Harris IA, Naylor JM, Adie S, Mittal R: *J Orthop Surg (Hong Kong)* 19: 309-313 (2011).
- [21] Vijayaraghavan V, Sabane AV, Tejas K: *J Indian Prosthodont Soc* 12: 201-207 (2012).
- [22] Dalat F, Barnoud R, Fessy MH, Besse JL: *Orthop Traumatol Surg Res* 99: S285-S295 (2013).
- [23] Mistry S, Kundu D, Datta S, Basu D: *Aust Dent J* 56: 68-75 (2011).
- [24] So K, Kanatani KT, Kuroda Y, Nakamura T, Matsuda S, Akiyama H: *Acta Orthop* 83: 599-603 (2012).
- [25] Carinci F, Grecchi E, Bignozzi CA, Murmura G, Piattelli A, Scarano A: *Dent Res J (Isfahan)* 9: S142-S146 (2012).
- [26] Abtahi J, Tengvall P, Aspenberg P: *Bone* 50: 1148-1151 (2012).
- [27] Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Fraczek A, Blazewicz S, Kromka A, Vanecek M, Svorcik V: *Diam Relat Mater* 16: 2133-2140 (2007).
- [28] Grausova L, Kromka A, Bacakova L, Potocky S, Vanecek M, Lisa V: *Diam Relat Mater* 17: 1405-1409 (2008).
- [29] Grausova L, Bacakova L, Kromka A, Potocky S, Vanecek M, Nesladek M, Lisa V: *J Nanosci Nanotechnol* 9: 3524-3534 (2009).
- [30] Grausova L, Bacakova L, Kromka A, Vanecek M, Rezek B, Lisa V: *Diam Relat Mater* 18: 258-263 (2009).
- [31] Webster TJ, Schadler LS, Siegel RW, Bizios R: *Tissue Eng* 7: 291-301 (2001).
- [32] Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ: *J Biomed Mater Res A* 70: 129-138 (2004).
- [33] Vagaska B, Bacakova L, Filova E, Balik K: *Physiol Res* 59: 309-322 (2010).
- [34] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V: *Biotechnol Adv* 29: 739-767 (2011).
- [35] Amaral M, Dias AG, Gomes PS, Lopes MA, Silva RF, Santos JD, Fernandes MH: *Biomed Mater Res A* 87: 91-99 (2008).
- [36] Kalbacova M, Rezek B, Baresova V, Wolf-Brandstetter C, Kromka A: *Acta Biomater* 5: 3076-3085 (2009).
- [37] Rezek B, Ukraintsev E, Kromka A, Ledinsky M, Broz A, Noskova L, Hartmannova H, Kalbacova M: *Diam Rel Mater* 19:153-157 (2010).
- [38] Bacakova L, Kopova I, Stankova L, Liskova J, Vacik J, Lavrentiev V, Kromka A, Potocky S, Stranska D: *Phys. Stat. Sol. A*, in press
- [39] Kloss FR, Gassner R, Preiner J, Ebner A, Larsson K, Hächl O, Tuli T, Rasse M, Moser D, Laimer K, Nickel EA, Laschober G, Brunauer R, Klima G, Hinterdorfer P, Steinmüller-Nethl D, Lepperdinger G: *Biomaterials* 29: 2433-2442 (2008).
- [40] Cubitt J, McAndrew A: *BMJ Case Rep* (2010) doi: 10.1136/bcr.02.2010.2777
- [41] Corinaldesi G, Piersanti L, Piattelli A, Iezzi G, Pieri F, Marchetti C: *Br J Oral Maxillofac Surg* 51: 247-252 (2013).
- [42] Kopecek M, Bacakova L, Vacik J, Fendrych F, Vorlicek V, Kratochvilova I, Lisa V, Van Hove E, Mer C, Bergonzo P, Nesladek M: *Physica Status Solidi A* 205: 2146-2153 (2008).
- [43] Grausova L, Kromka A, Burdíkova Z, Eckhardt A, Rezek B, Vacik J, Haenen K, Lisa V, Bacakova L: *PLoS One* 6(6): e20943 (2011).

WSPOMAGANIE WZROSTU KOMÓREK KOSTNYCH NA HYDROŻELACH Z GUMY GELLAN ZA POMOCĄ MINERALIZACJI ENZYMATYCZNEJ

KRZYSZTOF PIETRYGA¹, JOANA COSTA², PEDRO PEREIRA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{2*}

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

² UNIVERSITY OF PORTO, FACULTY OF ENGINEERING,
PRACA GOMES TEIXEIRA, 4099-002 PORTO, PORTUGAL

³ NANO AND BIOPHOTONICS GROUP,
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOTECHNOLOGY,
UNIVERSITY OF GHENT, COUPURE LINKS 653, BELGIUM

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

Streszczenie

Enzymatyczna mineralizacja hydrożeli jest obiecującym sposobem uzyskiwania materiałów do leczenia ubytków tkanki kostnej. Dzięki wytworzeniu wewnątrz materiału fosforanów wapnia (CaP), hydrożele stają się sztywniejsze, przez co bardziej odpowiednie do regeneracji tkanki kostnej.

W przedstawionych badanych hydrożele z gumy gellan (GG) zawierające enzym – fosfatazę alkaliczną (ALP, 0,5 mg/ml) były mineralizowane poprzez inkubację w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP). Porównano trzy różne stężenia GG: 0,7; 1,2 i 1,6%. W celu oceny zawartości CaP oznaczono suchą masę mineralizowanych próbek. Rozmieszczenie fazy mineralnej obserwowano w mikroskopie świetlnym na przekrojach. Przeprowadzono również testy mechaniczne w próbie ściskania. W badaniach komórkowych komórki osteoblastopodobne MG-63 hodowano na powierzchni materiałów jak i na przekrojach w okresie 1 oraz 7 dni. Żywotność komórek oznaczono przy pomocy barwienia live/dead.

Badania mechaniczne wykazały znacznie wyższy moduł Younga w przypadku materiałów zmineralizowanych w porównaniu z czystymi hydrożelami jednak wzrost ten nie był tak wyraźny dla hydrożeli o wyższym stężeniu GG. Z powodu wypłukiwania ALP, rozmieszczenie fazy mineralnej w obrębie próbek nie było jednorodne: większość CaP tworzyła się wewnątrz materiału. Obecność fazy mineralnej sprzyjała adhezji komórek MG-63 do materiału, ich rozplaszczaniu jak również przeżywalności.

Słowa kluczowe: hydrożel, kompozyt, mineralizacja, fosfataza alkaliczna

[Inżynieria Biomateriałów 125 (2014) 6-12]

PROMOTION OF BONE CELLS GROWTH ON GELLAN GUM HYDROGELS BY ENZYMATIC MINERALIZATION

KRZYSZTOF PIETRYGA¹, JOANA COSTA², PEDRO PEREIRA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{2*}

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

² UNIVERSITY OF PORTO, FACULTY OF ENGINEERING,
PRACA GOMES TEIXEIRA, 4099-002 PORTO, PORTUGAL

³ NANO AND BIOPHOTONICS GROUP,
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOTECHNOLOGY,
UNIVERSITY OF GHENT, COUPURE LINKS 653, BELGIUM

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

Abstract

Enzymatic mineralization of hydrogels is a promising approach to obtain new materials for the treatment of bone tissue defects. Thanks to creation of calcium phosphates (CaP) inside the material, the hydrogel becomes more rigid and therefore more suitable for bone tissue replacement.

In this study, gellan gum (GG) hydrogels containing the enzyme alkaline phosphatase (ALP, 0.5 mg/ml) were mineralized by incubation in mineralization solutions of calcium glycerophosphate (CaGP). Three different concentrations of GG were compared: 0.7, 1.2 and 1.6% (w/v). In order to assess amount of CaP formed, dry mass percentage was calculated while distribution of mineral phase was observed by light microscopy. Mechanical tests in compression mode were also carried out. Osteoblast-like MG-63 cells were cultured for 1 and 7 days on the surface and cross-sections of mineralized and non-mineralized samples. Viability of cells was measured by live/dead staining.

Mechanical testing revealed that Young's modulus of mineralized hydrogels was much higher than unmineralized hydrogels. However, this increase was not particularly pronounced for samples of higher GG content. Due to ALP leaching, the distribution of minerals was inhomogeneous: most of the mineral phase was formed inside the material. The presence of CaP in mineralized samples promoted attachment, spreading and viability of MG-63 cells.

Keywords: hydrogel, composite, mineralization, alkaline phosphatase

[Engineering of Biomaterials 125 (2014) 6-12]

Wstęp

Guma gellan (GG) jest wiążącym wapń, anionowym polisacharydem wytwarzanym przez bakterie (*Sphingomonas elodea*) w procesie fermentacji tlenowej. W skład GG wchodzi powtarzające się jednostki tetrasacharydowe zbudowane z glukozy, kwasu glukuronowego i ramanozy w stosunku 2:1:1. [1,2]. GG jest szeroko wykorzystywana w przemyśle spożywczym oraz farmaceutycznym [3]; ostatnio stosowana jest także jako materiał do regeneracji chrząstki [4-6]. GG stosowano też w charakterze rusztowania do inżynierii tkankowej, jako nośnik leków oraz materiał wstrzykiwany. Zaletą GG jest niski koszt, wysoka biogodność, biodegradowalność, niska toksyczność produktów rozkładu oraz to, że nie jest to produkt pochodzenia zwierzęcego. Jedną z głównych wad GG w kontekście zastosowań w regeneracji tkanki kostnej jest jej słaba wytrzymałość mechaniczna [1,3,7]. W prowadzonych ostatnio badaniach postuluje się wprowadzenie do żelu fazy nieorganicznej w postaci nanocząstek apatytowego fosforanu wapnia mogącego swoją strukturą przypominać nanostrukturę tkanki kostnej [8].

Mineralizacja GG fosforanem wapnia odbywa się poprzez inkubację w roztworze glicerofosforanu wapnia (CaGP) przy jednoczesnej obecności w żelu enzymu – fosfatazy alkalicznej (ALP). ALP katalizuje uwalnianie grupy fosforanowej z CaGP, co zwiększa lokalne stężenie jonów fosforanowych i umożliwia precipitację nierozpuszczalnych soli fosforanowych [8,9].

Fizyczne oraz biologiczne właściwości enzymatycznie mineralizowanej gumy gellan w charakterze zastosowań do tkanki kostnej były badane przez Douglasa i wsp. [9,10]. W pierwszej pracy podatność na mineralizację oraz sztywność żeli z 0,7% GG poprawiano przez wprowadzenie polidopaminy (PDA) [9]. W drugiej pracy materiał mineralizowano fosforanem wapnia oraz fosforanem magnezu (MgP) poprzez inkubację CaGP oraz glicerofosforanie magnezu (MgGP) [10]. Obecność MgP oraz PDA w zmineralizowanych żelach sprzyjała adhezji i poprawiała przeżywalność komórek osteoblastycznych (MC3T3-E1) nie powodując jednocześnie pogorszenia cytozgodności materiału.

Celem niniejszych badań było lepsze zrozumienie procesu enzymatycznej mineralizacji GG, przede wszystkim w kontekście rozlokowania fazy mineralnej oraz jej stabilności w obrębie materiału. W tym celu żele o różnych stężeniach GG (0,7; 1,2; 1,6% GG) i zawartości ALP równej 0,5 mg/ml, tj. niższej niż wykorzystywanej w pracach Douglasa i in. (2,5 mg/ml), poddano procesowi mineralizacji. Następnie analizowano ich właściwości zaraz po mineralizacji, a także po 7 dniowej inkubacji w wodzie. Dodatkowo przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem komórek osteoblastopodobnych MG-63 hodując je na powierzchni oraz na przekrojach zmineralizowanych materiałów. Badania te miały na celu stwierdzenie czy obecność fazy mineralnej wpływa na adhezję i przeżywalność komórek.

Materiały i metody

Przygotowanie żelu

Hydrożele GG (Gelzan™ CM, G1910, Sigma-Aldrich) zawierające ALP (P7640, Sigma-Aldrich) przygotowano przez ogrzanie wodnego roztworu GG do temp. 90°C oraz dodanie CaCl_2 (0,03% w/v) jako czynnika sieciującego [6]. Po schłodzeniu do 50°C dodano ALP (0,5 mg/ml), a roztwór wylano na płytki Petriego i pozostawiono do ochłodzenia. Po żelifikacji z żeli przy pomocy wycinaka wycięto cylindryczne próbki (12 i 4 mm średnicy, 4 mm wysokości). Przygotowano sześć rodzajów próbek: 0,7; 1,2; 1,6% GG z 0,5 mg/ml ALP oraz bez ALP.

Introduction

Gellan gum (GG) is an anionic calcium-binding polysaccharide produced by bacteria (*Sphingomonas elodea*) during aerobic fermentation. It consists of repeating tetrasaccharide units of glucose, glucuronic acid and rhamnose in a 2:1:1 ratio [1,2]. It is widely used in the food and pharmaceutical industries [3] and more recently it has been used as a hydrogel biomaterial for cartilage regeneration [4-6]. GG has been applied as a tissue engineering scaffold for controlled drug delivery and as an injectable material. Further advantages of GG are its low cost, high biocompatibility, biodegradability and the low toxicity of its by-products, as well as the fact that it is not animal-derived, avoiding regulatory concerns. One of the main disadvantages concerning the application of GG as an alternative strategy for bone regeneration is its low mechanical strength [1,3,7]. Many studies have explored the reinforcement of hydrogels by the use of inorganic phases, such as apatitic calcium phosphate (CaP) nanoparticles, because they closely resemble the nanostructured mineral phase of bone tissue [8].

The mineralization of GG with CaP minerals can be achieved by the incorporation of an enzyme, alkaline phosphatase (ALP), during incubation in solutions containing calcium glycerophosphate (CaGP). The ALP uses the CaGP as a substrate, cleaving the phosphate and, thereby increasing its local concentration, enabling the precipitation of insoluble phosphate salts [8,9].

Physical and biological properties of enzymatically mineralized GG with a focus on bone regeneration applications were studied by Douglas *et al* [9,10]. Mineralizability and stiffness of 0.7% GG gels was enhanced by the incorporation of polydopamine (PDA) [9]. In a second study CaP and magnesium phosphate (MgP) mineral formation in 0.7% GG hydrogels was performed by incubation in CaGP and magnesium glycerophosphate (MgGP) solutions [10]. The presence of MgP as well as PDA in mineralized samples promoted attachment and vitality of osteoblastic MC3T3-E1 cells and did not negatively impact the materials' cytocompatibility.

The aim of this study was to gain a deeper understanding of mineralization process of GG with CaGP in terms of mineral phase distribution and its stability within the material. To this end different concentrations of GG (0.7, 1.2, 1.6% GG (w/v)) and ALP content (0.5 mg/ml) lower than that used by Douglas *et al.* (2.5 mg/ml) were used to produce mineralized hydrogels and the properties of the materials were analyzed prior to and after incubation in water for 7 days. Moreover osteoblast-like MG-63 cells were cultured on the outer surfaces as well as on the cross sections of mineralized materials to ascertain if differences in mineral phase concentrations affect cell adhesion and viability.

Materials and Methods

Gel preparation

GG (Gelzan™ CM, G1910, Sigma-Aldrich) hydrogels containing ALP (P7640, Sigma-Aldrich) were prepared by heating a GG solution to 90°C and addition of CaCl_2 as a crosslinker to reach a final CaCl_2 concentration of 0.03% (w/v) [6]. After cooling to 50°C ALP (0.5 mg/ml) was added, the solution was cast on glass Petri dishes at room temperature. After gelation cylindrical hydrogels samples (12 or 4 mm in diameter, 4 mm in height) were cut out with a hole punch. Six types of the samples were prepared: 0.7, 1.2, 1.6% GG with 0.5 mg/ml ALP and without ALP.

Uwalnianie ALP

Aby ocenić ubytek białka z żelu, próbki żeli GG (4 mm średnicy i 4 mm wysokości) inkubowano w 200 µl wody destylowanej. Dla każdego punktu czasowego 80 µl eluatu przenoszono do dołka płytki 96-dołkowej i dopełniano 80 µl odczynnika BCA (5 ml kwasu bitynchoninowego, 20 mg bezwodnego siarczany (II) miedzi - oba z Sigma-Aldrich i 500 µl H₂O). Absorbancję roztworu mierzono przy 570 nm po 30 min inkubacji. Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej, użyto pięć różnych stężeń ALP (0 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml and 2,5 mg/ml).

Mineralizacja

Próbki inkubowano 14 dni w roztworze 0.1 M CaGP (50043, Sigma-Aldrich) w temperaturze pokojowej. Roztwór CaGP wymieniano co drugi dzień. Po mineralizacji, żełe przemyto wodą dejonizowaną a następnie inkubowano w wodzie dejonizowanej 1 dzień w celu wypłukania pozostałości CaGP, jak również 7 dni w cel oceny stabilności fazy mineralnej.

Testy mechaniczne

Próbki hydrożeli (n=6) poddano testom mechanicznym na ściskanie na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435). Test przeprowadzono z szybkością ściskania 2 mm/min. Bazując na uzyskanej zależności naprężenie-odkształcenie moduł Younga wyznaczano z liniowego fragmentu krzywej (zakres w przedziale 0,2 do 5 N).

Sucha masa

Aby oznaczyć zawartość fazy mineralnej wyznaczono % suchej masy. Próbki ważono na mokro zaraz po mineralizacji (m_1) oraz po suszeniu w temp. 37°C przez okres 2 dni (m_2). Procent suchej masy (dmp) wyznaczono w oparciu o następujący wzór: $dmp = (m_2/m_1) \cdot 100\%$.

Badania biologiczne

Przekroje próbek (niezmineralizowanych – GG oraz zmineralizowanych – GG+ALP) uzyskano przez przecięcie cylindrycznej próbki na pół równolegle do podstawy cylindra. Próbki wysterylizowano pod UV przez 20 min (10 min z każdej strony), a następnie umieszczono w płytkach 24-dołkowych i inkubowano przez 2 h w 37°C w medium hodowlanym (DMEM, ATTC) z 10% FBS, 1% penicyliny/streptomycyny i 2 mM L-glutaminy. Następnie, 200 µl zawiesiny komórek MG-63 (3×10^4 komórek) naniesiono na powierzchnię każdej próbki. Po 10 min, dodano 800 µl DMEM. Komórki hodowano przez okres 1 oraz 7 dni w temp. 37°C i 5% CO₂. W celu oceny przeżywalności do każdego dołka dodano 1 ml roztworu barwnika (20 ml PBS, 20 µl kalceiny i 20 µl jodku propidyny, Sigma) i inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wybarwione preparaty obserwowano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego (Axiovert, Zeiss).

Wyniki

RYŚ. 1 przedstawia uwalnianie ALP z próbek GG-ALP w czasie 3 dni inkubacji w wodzie. Najbardziej intensywny proces uwalniania ALP zaobserwowano w pierwszych godzinach inkubacji. Po 2 godzinach około 50% ALP zostało uwolnione z żelu, a po 3 dniach praktycznie całe ALP zostało wypłukane przez wodę. Próbki zawierające 1,6% GG wykazywały tendencję do szybszego uwalniania ALP niż żełe 0,7% i 1,2% GG.

ALP release studies

To evaluate the protein loss, GG disks (4 mm in diameter and 4 mm in height) were incubated in 200 µl of water over different periods of time. At each time point the water was removed and 80 µl were added to one well of a 96-well plate. 80 µl of BCA reagent (5 ml bitynchonic acid solution, 20 mg of copper II sulfate anhydrous pure - both from Sigma-Aldrich and 500 µl H₂O) were then added and the absorbance was measured at 570 nm after 30 min of incubation. For the standard curve, five different concentrations of ALP were prepared (0 mg/ml, 0.05 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml and 2.5 mg/ml).

Mineralization

The samples were incubated in 0.1 M CaGP (50043, Sigma-Aldrich) solution at room temperature over 14 days. Mineralization medium was changed every other day. After mineralization, the gels were rinsed with UHQ-water and subsequently incubated in UHQ-water for 1 day with the aim of removing residual CaGP and 7 days to assess mineral phase stability.

Mechanical test

Hydrogel samples (n=6) were subjected to compressive testing in a universal testing machine (Zwick 1435). Samples were tested with compressing speed of 2 mm/min. Based on the obtained force - strain curve Young's modulus was determined from the linear dependence: from 0.2 to 5 N.

Dry mass

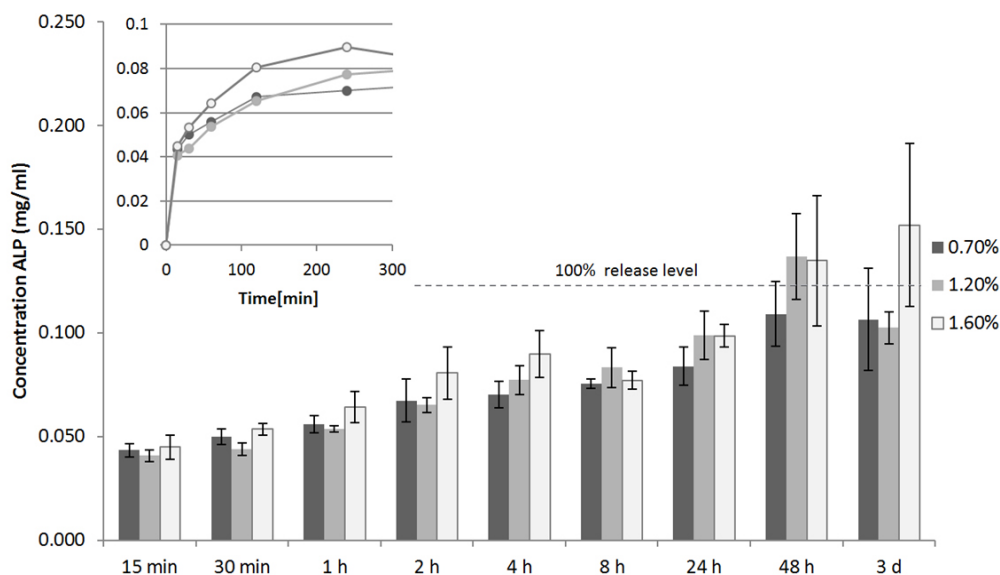
To determine formed mineral content mass change was measured. Samples were weighed after incubation (m_1) and after drying at 37°C for 2 days (m_2). The dry mass percentage (dmp) was calculated according to the formula: $dmp = (m_2/m_1) \cdot 100\%$.

Cell culture

Cross-sections of the samples (non-mineralized GG and mineralized GG+ALP) were prepared by cutting the samples into halves parallel to the bases of the cylinders. The samples were sterilized under UV light for 20 min (10 min from each side), placed in 24-well plates and incubated at 37°C for 2 h in minimal essential medium (DMEM, ATTC), supplemented with 10% FBS, 1% penicilin/streptomycin and 2 mM L-glutamine. Afterwards, 200 µl of MG-63 cell suspension (3×10^4 cells) were added on the surface of each sample. After 10 min, 800 µl of DMEM were added and the cells were cultured for 1 and 7 days at 37°C and 5% CO₂. To assess cell viability, 1 ml of staining solution (20 ml of PBS, 20 µl of calcein and 20 µl of propidium iodide, both from Sigma) was added to each well and incubated for 20 min at room temperature. Afterwards, the samples were observed under a fluorescence microscope (Axiovert, Zeiss).

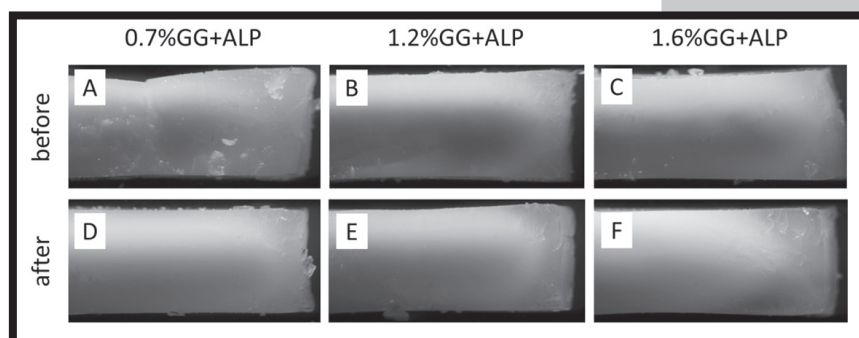
Results

FIG. 1 shows concentration of ALP released from GG-ALP samples during 3 days. The most intensive release of ALP was observed in the first hour of the experiment. After 2 h 50% of ALP was released and after 3 days practically all the ALP introduced was leached out. The samples with 1.6% GG showed the tendency to release ALP faster than those with 0.7% and 1.2% GG.



RYS. 1. Stężenie ALP uwalnianej z cylindrycznych próbek GG-ALP po 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h i 3 dniach inkubacji wodzie (n=3, brak istotnych statystycznie różnic w obrębie poszczególnych grup w danym okresie czasu według testu ANOVA). Przerywaną linią zaznaczono maksymalne stężenie ALP w żelu. Wykres w postaci wstawkі pokazuje kinetykę zmian w pierwszych 300 min inkubacji.

FIG. 1. Concentration of ALP released from GG-ALP disks after 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h and 3 days in water (n=3, no significant differences between sample groups at each time point according to ANOVA). Dashed line represents concentration for 100% of ALP released. The insert presents ALP release kinetics from 0 to 300 min.



RYS. 2. Przekroje zmineralizowanych próbek żeli o różnym stężeniu GG (0,7% - A, D; 1,25% - B, E; 1,6% C, F) przed (A, B, C) i po 7 dniowej inkubacji w wodzie (D, E, F).

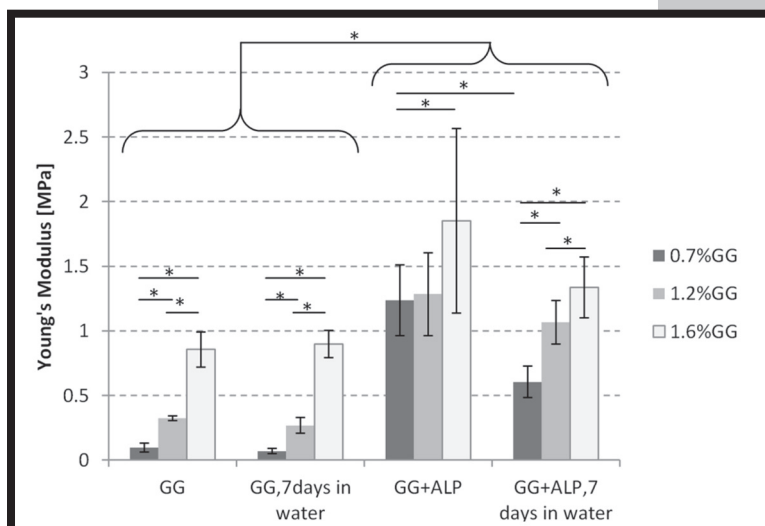
FIG. 2. Cross-sections of mineralized GG gels with different concentration of GG (0.7% - A, D; 1.25% - B, E; 1.6% C, F) before (A, B, C) and after 7-day incubation in water (D, E, F).

RYS. 2 pokazuje przekroje zmineralizowanych próbek żeli różniących się stężeniem GG przed oraz po 7 dniowej inkubacji w wodzie. Faza mineralna w każdym przypadku była ulokowana wewnątrz żelu natomiast powierzchnia próbki pozostawała słabo zmineralizowana. Nie zaobserwowano istotnych różnic w pod względem ulokowania fazy mineralnej pomiędzy próbkami o poszczególnych stężeniach GG (RYS. 1 A,B,C). Próbki po 7 dniowej inkubacji w wodzie (RYS. 1 D,E,F) stały się bardziej przezroczyste: jest to szczególnie widoczne w przypadku brzegów próbki 1,6% GG (RYS. 1 F).

RYS. 3 przedstawia wyniki pomiarów modułów Younga niezmineralizowanych i zmineralizowanych żeli GG przed oraz po 7 dniach inkubacji wodzie. Dla próbek niezmineralizowanych moduł Younga wzrastał wraz ze wzrostem stężenia GG: próbki zawierające 1,6% GG były około 5 razy sztywniejsze od próbek 0,7% GG. Moczenie w wodzie nie wpływało na właściwości mechaniczne tych żeli. Po mineralizacji moduły wszystkich materiałów były wyższe, jednak największy względny przyrost modułu zanotowano w przypadku próbki 0,7% GG. Nie było istotnych różnic pomiędzy modułem Younga próbek 0,7 i 1,2% GG, jedynie próbka 1,6% GG wykazywała wyraźnie większy moduł od pozostałych. Po inkubacji w wodzie istotny statystycznie spadek modułu Younga zanotowano dla próbki 0,7% GG.

FIG. 2 presents cross-sections of mineralized gels with different concentrations of GG before and after 7-day incubation in water. In every case, the mineral phase was located mostly inside the gel while the regions close to the surface were poorly mineralized. There were no visual differences in terms of mineral phase distribution just after the mineralization process between hydrogels with different GG concentrations (FIG. 1 A,B,C). On the other hand the samples after incubation in water for 7 days (FIG. 1 D,E,F) seemed to be more transparent. This was especially visible on the edges of the 1.6% GG sample (FIG. 1 F).

FIG. 3 shows the results of Young's modulus of non-mineralized and mineralized GG samples prior and after incubation in water for 7 days. For the samples without ALP Young's modulus increased with GG concentration. Samples containing 1.6% GG were approximately 5 times more rigid than 0.7% GG. Soaking in water did not influence mechanical properties of those gels. After mineralization, Young's modulus of every material was higher, although the biggest relative gain of this parameter was noted for 0.7% GG samples. There was no significant difference in Young's modulus between 0.7 and 1.2% GG after mineralization. Only 1.6% GG samples had significantly higher Young's modulus. After incubation in water, a significant drop in stiffness was noted in 0.7% GG samples.

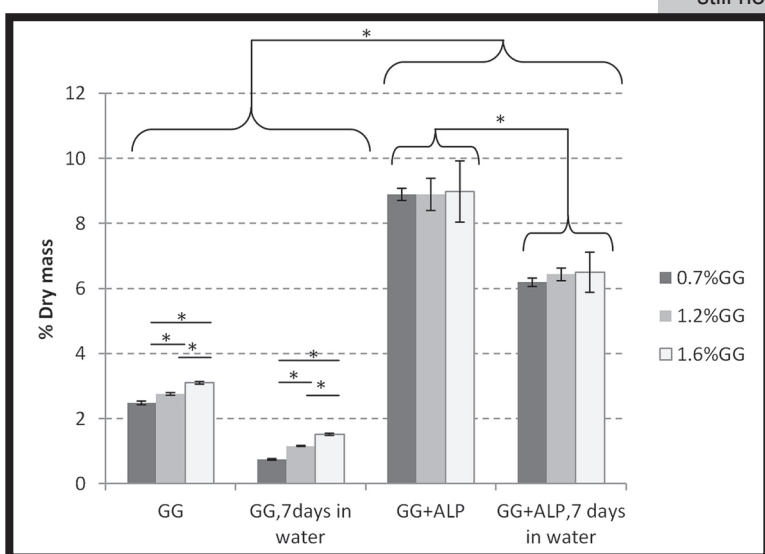


RYS. 3. Moduł Younga zmineralizowanych (GG+ALP) oraz niezmineralizowanych (GG) żeli różniących się stężeniem GG (0,7; 1,2 and 1,6%) przed oraz po inkubacji w wodzie; (n=6, istotność statystyczna *p< 0.05 według testu ANOVA).

FIG. 3. Young's Modulus of mineralized (GG+ALP) and non-mineralized (GG) gel samples with different concentrations of GG (0.7, 1.2 and 1.6%) before and after incubation in water; (n=6, significant difference *p< 0.05 according to ANOVA).

Zmiany procentu suchej masy po inkubacji w wodzie przedstawiono na RYS. 4. Znotowano spadek suchej masy (około 1%) dla wszystkich próbek nie zawierających ALP po inkubacji w wodzie. Sucha masa po mineralizacji była około 4 krotnie wyższa niż przed mineralizacją dla wszystkich próbek i wynosiła około 8%. Nie zanotowano istotnych różnic pod względem procentu suchej masy pomiędzy próbkami o różnym stężeniu GG. Po inkubacji w wodzie wszystkie próbki wykazywały znaczący spadek suchej masy do poziomu około 6% jednak nadal nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic dla próbek o różnym stężeniu GG.

Dry mass changes after mineralization and after incubation in water are presented in FIG. 4. There was a drop in dry mass (approximately 1%) of the GG samples without ALP after soaking in water. Dry mass after mineralization was approximately four times higher than before mineralization for every sample and accounted for approximately 8%. There were no significant differences in dry masses after mineralization between the samples with different concentrations of GG. After incubation in water a significant decrease of dry masses up to 6% was noticed but the differences between the samples with various GG concentrations were still not significant.

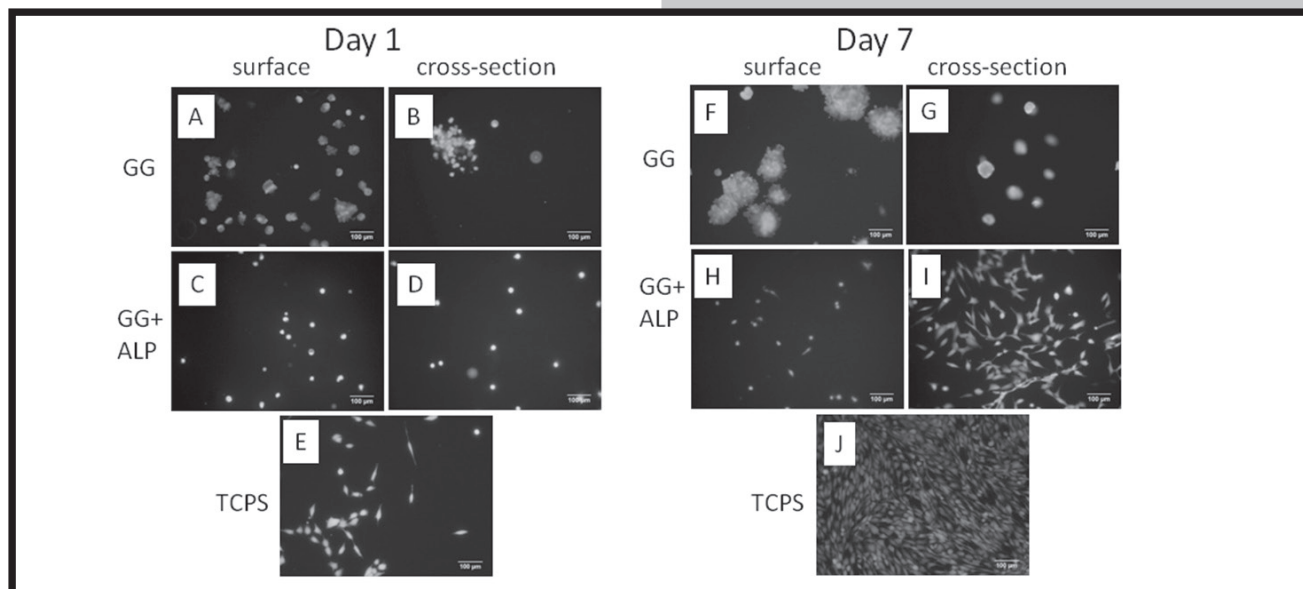


RYS. 4. Procent suchej masy zmineralizowanych (GG+ALP) i niezmineralizowanych (GG) żeli różniących się stężeniem GG (0,7; 1,2 i 1,6%) przed oraz po inkubacji w wodzie; (n=6, istotność statystyczna *p< 0.05 według testu ANOVA).

FIG. 4. Dry mass percentage of mineralized (GG+ALP) and non-mineralized (GG) gel samples with different concentration of GG (0.7, 1.2 and 1.6%) before and after incubation in water; (n=6, significant differences *p< 0.05 according to ANOVA).

Obrazy barwienia live/dead komórek hodowanych na powierzchni materiałów jak również na przekrojach przedstawiono na RYS. 5. Żywe komórki (zabarwione na zielono) były obecne na wszystkich badanych materiałach: zmineralizowanych oraz niezmineralizowanych. Jednak oba typy materiałów charakteryzowały wyraźne różnice w morfologii rosnących na nich komórek. Na materiale niezmineralizowanych komórki wykazywały tendencję do wzrostu w postaci klastrow (RYS. 5 A,B,F,G) podczas gdy na materiale zmineralizowanym komórki po 1 dniu były znacznie bardziej równomiernie rozmieszczone (RYS. 5 C,D,H,I). Jednak w porównaniu z TCPS komórki te były znacznie słabiej rozplaszczone (RYS. 5 E). Po 7 dniach komórki przyjmowały bardziej rozplaszczoną i wydłużoną postać, a ich morfologia była zbliżona do tych rosnących na TCPS (RYS. 5 E,J). Większą gęstość komórek zanotowano dla przekrojów zmineralizowanych próbek (RYS. 5 I) w porównaniu z komórkami rosnącymi na powierzchni (RYS. 5 H).

Live/dead staining of the cells cultured on the surface of the materials as well as on their cross-sections are presented in FIG. 5. Live (stained in green) cells were found on all samples studied, both mineralized as well as non-mineralized. However there were pronounced differences in morphology between these groups. Cells on non-mineralized GG gels had a tendency to grow in clusters (FIG. 5 A,B,F,G) whereas on mineralized materials cells were more evenly separated on day 1 (FIG. 5 C,D,H,I). However their spreading was reduced compared to that on TCPS (FIG. 5 E). After day 7 (FIG. 5 H,I) the cells were spreading over the surface and their morphology was similar to that on TCPS (FIG. 5 E,J). Higher cell density was observed on the cross-section of mineralized samples (FIG. 5 I) than on the material surface (FIG. 5 H).



RYS. 5. Barwienie live/dead komórek MG-63 po 1 dniu (A-E) i 7 dniach (F-J). Komórki hodowano na powierzchni (A, C i F, H) oraz na przekrojach (B, D i G, I) niezmineralizowanych żeli GG (A, B, F, G) oraz zmineralizowanych żeli GG+ALP (C, D, H, I). Dodatkowo przedstawiono komórki na materiale odniesienia (TCPS) po 1 dniu (E) oraz 7 dniach (J). **FIG. 5.** Live/dead staining of MG-63 cells after 1 day (A-E) and 7 days (F-J). Cells were cultured on the surfaces (A, C and F, H) and cross-sections (B, D and G, I) of GG samples non-mineralized (A, B, F, G), and mineralized GG+ALP samples (C, D, H, I). Cells on reference TCPS on day 1 (E) and day 7 (J) are also present.

Dyskusja wyników

Testy mechaniczne na ściskanie hydrożeli po 14 dniowej mineralizacji w CaGP wykazały wzrost modułu Younga wszystkich próbek zawierających ALP (RYS. 3). Było to spowodowane formowaniem się fazy mineralnej (CaP) w hydrożelach w obecności enzymu – ALP, co wykazano już we wcześniejszych badaniach [8,9]. Obecność minerałów została potwierdzona poprzez pomiar procentu suchej masy (RYS. 4). Rozmieszczenie CaP zostało uwidocznione poprzez przygotowanie przekrojów zmineralizowanych żeli. Wykazano, że największa zawartość fazy mineralnej znajdowała się wewnątrz żelu, podczas gdy powierzchnia i brzegi próbki były zmineralizowane w niewielkim stopniu (RYS. 2).

Według naszej hipotezy niejednorodne rozlokowanie fazy CaP jest spowodowane wypłukiwaniem ALP z powierzchni materiału w czasie moczenia w roztworze do mineralizacji (CaGP) co sprawia, że tylko wewnętrzna część żelu zachowuje wystarczającą ilość enzymu niezbędną do pełnej mineralizacji. W naszym eksperymencie wykazano, że ponad połowa ALP jest uwalniana z żelu do roztworu podczas pierwszych 2 h inkubacji w wodzie (RYS. 1). Podobna kinetyka procesu wymywania była prezentowana dla gumy gellan o innym stężeniu ALP [9].

Drugim zjawiskiem odpowiedzialnym za zmianę stężenia CaP w obrębie żelu jest rozpuszczanie fazy mineralnej w roztworze wodnym. Podczas procesu przygotowania próbek inkubacja w wodzie jest niezbędnym etapem pozwalającym na wypłukanie pozostałości CaGP ze zmineralizowanego materiału. Nasze badania pokazują, że faza CaP nie jest całkowicie stabilna w roztworze wodnym, na co wskazuje znaczący spadek modułu Younga oraz procentu suchej masy po 7 dniowym okresie inkubacji w wodzie (RYS. 3 i 4). Ubytek fazy mineralnej został również wykazany na przekrojach żeli (RYS. 2 D,E,F). Choć ubytek masy nie był zależny od stężenia żelu (RYS. 4), spadek modułu Younga był bardziej wyraźny dla żeli 0,7 niż 1,6% GG. (RYS. 3). Wynik ten sugeruje że poprzez zmianę stężenia GG możliwe jest ograniczenie utraty ALP oraz CaP z żelu, jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Discussion

Compressive testing of the hydrogels after 14 days incubation in mineralization solution (CaGP) revealed an increase in Young's modulus of every sample containing ALP (FIG. 3). It is due to formation of a mineral phase (CaP) in hydrogels in the presence of ALP as previously reported in other studies [8,9]. The presence of minerals was demonstrated by the increase in dry mass percentages of the samples (FIG. 4). Distribution of CaP was visualized by preparing cross-sections of mineralized samples. It was found that the majority of the minerals were concentrated inside the gels, whereas the surface and edges of the samples were only mildly mineralized (FIG. 2).

Our hypothesis is that inhomogeneous distribution of CaP may be attributed to leaching out of ALP from the surface of the samples during soaking in mineralization solution, as a result of which only the inner part of the sample contains a sufficient amount of enzyme to be fully mineralized. In our experiment it was found that more than half of the amount of ALP was released from the samples during the first 2 h of incubation in water (FIG. 1). Similar ALP release kinetics was measured previously for GG with different concentration [9].

The second phenomenon affecting mineral concentration in the samples is CaP dissolution in aqueous media. During the manufacturing procedure, one day incubation in water is applied to remove residual CaGP from the mineralized material. Our results show that the CaP phase is not completely stable in the aqueous environment, which is indicated by substantial loss in Young's modulus and dry mass after 7 days incubation in water (FIG. 3 and 4). Mineral phase loss was also demonstrated on sample cross-sections (FIG. 2 D,E,F). Although mass loss was independent of the GG concentration (FIG. 4), Young's modulus decrease was the more pronounced for 0.7% than for 1.6% GG samples (FIG. 3). Such results suggest that by changing GG concentration it is possible to reduce ALP as well as mineral release from the samples, but further studies are needed.

Nasze badania komórkowe wykazały różnicę w zachowaniu się komórek pomiędzy żelami niezmineralizowanymi a zmineralizowanymi (RYS. 5). W pierwszym przypadku komórki miały kształt okrągły, były słabo rozplaszczane co sugeruje ich słabą adhezję do podłoża. Po 7 dniach komórki na tym materiale tworzyły klastry. Natomiast na zmineralizowanym GG komórki były bardziej równomiernie rozłożone na powierzchni po 1 dniu a po 7 dniach ich morfologia przypominała morfologię komórek rosnących na TCPS (RYS. 5). Podobne wyniki zostały już opublikowane przez Douglasa i wsp., którzy badali 0,7% żele GG przed oraz po procesie mineralizacji [9,10]. Nasze badania wykazują jednak istnienie ciekawego zjawiska: mianowicie liczba komórek rosnących na przekrojach materiałów była znacząco większa od liczby komórek rosnących na powierzchni. Przyczyną tego może być utrata minerałów i ekspozycja matrycy polimerowej żelu GG, która nie sprzyja adhezji komórek.

Wnioski

Poprzez inkubację w roztworze CaGP żeli zawierających ALP wytworzono w ich wnętrzu fazę mineralną. Mineralizacja enzymatyczna doprowadziła do wzrostu sztywności oraz procentu suchej masy wszystkich mineralizowanych materiałów. Proces tworzenia się fazy mineralnej był nierównomierny w obrębie próbki: silniejsza mineralizacja zachodziła wewnątrz niż na powierzchni. Hydrożele o wyższym stężeniu GG były bardziej podatne na tworzenie słabiej zmineralizowanej powierzchni, co było wynikiem szybszego uwalniania ALP. Zmineralizowany żel wspierał adhezję oraz wzrost komórek a było to szczególnie widoczne na przekrojach materiałów, to znaczy w miejscach, gdzie stężenie fazy CaP było najwyższe.

Podsumowując, zjawisko niejednorodnej mineralizacji spowodowanej utratą enzymu oraz późniejszym wypłukiwaniem fazy mineralnej powinno zostać uwzględnione przy wytwarzaniu zmineralizowanych enzymatycznie materiałów do budowy tkanki kostnej.

Acknowledgement

Praca została sfinansowana z badań statutowych AGH (nr 11.11.160.616) i projektu NCN (Nr 2012/05/B/ST8/00129).

Our biological results show that cells' behavior is different if cells are cultured on non-mineralized or mineralized GG hydrogels (FIG. 5). In the first case, the cells are round, poorly spread, which suggests weak adhesion. After 7 days they form clusters. On the other hand, on mineralized GG the cells are evenly distributed on day 1 and after day 7 their well-spread morphology resembles that of cells on TCPS (FIG. 5). Similar results were already reported in the studies of Douglas et al. who studied GG samples of 0.7% concentration prior and after enzymatic mineralization [9,10]. However in our recent experiments we also found a very interesting phenomenon, namely a significantly higher number of cells on mineralized GG material cross-sections than on the outer surfaces. This can be attributed to surface mineral loss, leaving only the GG polysaccharide hydrogel matrix, which does not promote cell adhesion.

Conclusion

CaP mineral formation in GG hydrogels was induced by incorporation of ALP and subsequent incubation in CaGP solution. Enzymatic mineralization led to an increase in stiffness and dry mass of all materials. Mineral formation was inhomogeneous within the samples: more mineral was formed inside than on the outer surface. The samples with higher GG concentration were more prone to form mildly mineralized surfaces due to mineral and ALP loss. Mineralized gels promoted cell attachment and growth, especially in the case of cell culturing on sample cross-sections, i.e. where the concentration of mineral phase was the highest.

In summary, the processes of inhomogeneous mineralization caused by enzyme and mineral loss should be considered in order to produce materials for bone tissue engineering by enzymatic means.

Acknowledgement

This study was financed from statutory works of AGH (No 11.11.160.616) and Polish National Science Center (Grant No. 2012/05/B/ST8/00129).

Piśmiennictwo

- [1] I. Giavasi, L. M. Harvey, and B. McNeil: Gellan gum. Critical Reviews in Biotechnology 20.3 (2000) 177-211.
- [2] T. Okamoto, K. Kubota: Sol-gel transition of polysaccharide gellan gum. Carbohydrate Polymers 30.2 (1996) 149-153.
- [3] A.M. Fialho, L.M. Moreira, A.T. Granja, A.O. Popescu, K. Hoffmann, I. Sá-Correia: Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 79.6 (2008) 889-900.
- [4] J.E. Roldan, Hydrogels: Introduction and Applications in Biology and Engineering, Louisiana Tech University Dept. of Biological Sciences, 2003.
- [5] J. Fan, Y. Gong, L. Ren, R.R. Varshney, D. Cai, D.A. Wang: In vitro engineered cartilage using synovium-derived mesenchymal stem cells with injectable gellan hydrogels. Acta Biomaterialia 6.3 (2010) 1178-1185.
- [6] J.T. Oliveira, L. Martins, R. Picciochi, P.B. Malafaya, R.A. Sousa, N.M. Neves, J.F. Mano, R.L. Reis: Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. Journal of Biomedical Materials Research Part A 93.3 (2010) 852-863.

References

- [7] E. Miyoshi, T. Takaya, K. Nishinari: Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. Carbohydrate Polymers 30.2 (1996) 109-119.
- [8] T.E. Douglas, E. Pamula, S. Leeuwenburgh: Biomimetic Mineralization of Hydrogel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. In Biomimetics Published by John Wiley & Sons Inc, 2013
- [9] T. Douglas, M. Włodarczyk, E. Pamula, H. Declercq, E. de Mulder, M. Bucko, L. Balcaen, F. Vanhaecke, R. Cornelissen, P. Dubruel, J. Jansen, S. Leeuwenburgh: Enzymatic mineralization of gellan gum hydrogel for bone tissue-engineering applications and its enhancement by polydopamine. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 8 (2014) 906-918.
- [10] T.E. Douglas, G. Krawczyk, E. Pamula, H.A. Declercq, D. Schaubroeck, M.M. Bucko, L. Balcaen, P. van Der Voort, V. Bliznuk, N.M. van den Vreken, M. Dash, R. Detsch, A.R. Boccaccini, F. Vanhaecke, M. Cornelissen, P. Dubruel: Generation of composites for bone tissue engineering applications consisting of gellan gum hydrogels mineralized with calcium and magnesium phosphate phases by enzymatic means. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2014), DOI:10.1002/term.1875.

ANALIZA BIOMECHANICZNA WKŁADU KORONOWO- KORZENIOWEGO Z WYKORZYSTANIEM METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH

SONIA LOSKA*, ZBIGNIEW PASZENDA, MARCIN BASIAGA,
ANNA ZIĘBOWICZ, MARTA KIEL-JAMROZIK

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

* E-MAIL: SONIA.LOSKA@POLSL.PL

Streszczenie

Destrukcyjne korony zębów, będące wynikiem złamań lub zaawansowanej próchnicy z towarzyszącym im stanem zapalnym miazgi stanowią szczególny problem stomatologii zachowawczej. W praktyce klinicznej takie zęby leczone są endodontycznie, czyli kanałowo. Wynikiem takiego leczenia jest ząb martwy, bez miazgi, przygotowany do odbudowy. Jedną z metod stosowanych w procesie rekonstrukcji koron zębów po leczeniu endodontycznym, jest stosowanie metalowych wkładów koronowo-korzeniowych, które należą do grupy protez stałych jednoczłonowych oraz stanowią podbudowę pod uzupełnienie protetyczne. Na rynku dostępnych jest wiele rodzajów cementów stomatologicznych [1]. Aby ułatwić ich wybór, przeprowadzono analizę numeryczną układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb z wykorzystaniem trzech różnych rodzajów stosowanych cementów dentystycznych. Do analizy wytypowano wkład koronowo-korzeniowy Flexi-Post (wykonany ze stopu Ti6Al4V) ze względu na jego dużą retencję w kanale korzeniowym oraz mały nacisk na ścianę korzenia. Zakres przeprowadzonej analizy obejmował wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu w zależności od zastosowanego cementu stomatologicznego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największe wartości naprężeń zredukowanych występują w przypadku zastosowania cementu fosforanowo-cynkowego, gdzie wartość ta była 3-krotnie większa w porównaniu do cementu szklanojononowego oraz kompozytowego. Dodatkowo nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanego cementu na pozostałe elementy analizowanego układu wkład-ząb. Uzyskane wyniki analizy numerycznej układu wkład-ząb z wykorzystaniem metody elementów skończonych stanowią cenną metodykę dla prawidłowego zaprojektowania jego postaci, cech geometrycznych, doboru własności mechanicznych oraz stopnia umocnienia biomateriału metalowego.

Słowa kluczowe: odbudowa zębów po leczeniu endodontycznym, standardowe wkłady koronowo-korzeniowe, cementy dentystyczne

[Inżynieria Biomateriałów 125 (2014) 13-20]

BIOMECHANICAL ANALYSIS OF DENTAL POST-AND-CORE USING FINITE ELEMENT METHOD

SONIA LOSKA*, ZBIGNIEW PASZENDA, MARCIN BASIAGA,
ANNA ZIĘBOWICZ, MARTA KIEL-JAMROZIK

DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND
MEDICAL DEVICES ENGINEERING,
FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
UL. GENERAŁA CHARLESA DE GAULLE'A 72
41-800 ZABRZE, POLAND

* E-MAIL: SONIA.LOSKA@POLSL.PL

Abstract

The destruction of tooth crowns, resulting from fractures or advanced decay with an accompanying inflammation of the pulp is a particular problem in conservative dentistry. In clinical practice, these teeth are treated endodontically that is root canal therapy. The result of such treatment is inanimate tooth, without pulp, prepared for a reconstruction. One of the methods used in the process of reconstruction of the teeth crowns after endodontic treatment, is the use of metal endodontic posts-and-cores that belong to the group of monosegmental fixed dentures and constitute a foundation for restoration. There are a lot of different kinds of dental cements on the market [1]. In order to facilitate selection of the optimal system, numerical analysis of the dental post-and-core – tooth system (for three variants of dental cements) was carried out. The main aim of the present work was numerical analysis of the dental post-and-core – tooth system using finite element method. For the analysis the Flexi-Post was selected (made of Ti6Al4V alloy) because of its high retention in the root canal and a small pressure on the root's wall. The scope of the analysis included calculation of displacements, strains and stresses in the analyzed elements – depending on the applied dental cement. Based on the obtained results, it was found that the largest value of the equivalent stress occurred for zinc-phosphate cement. The value in this case was three times higher in comparison to the glass ionomer cement as well as composite cement. In addition, there was no significant influence of the cement used for other elements of the dental post-and-core – tooth system. The results of the analyzed system provide a valuable methodology for proper designing of its form, geometrical characteristics, the selection of the mechanical properties and an optimal degree of metallic biomaterial strengthening.

Keywords: restoration of teeth after endodontic treatment, standard post-and-core, dental cements

[Engineering of Biomaterials 125 (2014) 13-20]

Jeden z problemów stomatologii zachowawczej stanowią przypadki poważnych destrukcji koron zębów z towarzyszącym im stanem zapalnym miazgi. W praktyce klinicznej takie zęby są leczone endodontycznie. Po leczeniu ząb staje się martwy, nie posiada miazgi, jednak zachowany zdrowy korzeń stanowi naturalny wszczep i pozwala na wykorzystanie go do dalszej odbudowy. Pozostawienie wyleczonego i prawidłowo zabezpieczonego korzenia zęba pozwala w pewnym stopniu opóźnić proces zaniku kości wyrostka zębodołowego. Jedną z metod stosowanych w procesie rekonstrukcji takich koron zębów, jest stosowanie metalowych wkładów koronowo-korzeniowych, które należą do grupy protez stałych jednoczłonowych i stanowią podbudowę pod uzupełnienie protetyczne, zwiększając retencję wypełnienia a jednocześnie powinny zachować fizjologiczną drogę przenoszenia obciążeń wywieranych w trakcie żucia [2,3]. Wkłady koronowo-korzeniowe składają się z części koronowej będącej substytutem zniszczonych tkanek zęba oraz korzeniowej osadzonej w kanale zęba. Część koronowa wkładu tworzy podbudowę pod przyszłe uzupełnienie protetyczne, zaś część korzeniowa ma pełnić funkcję elementu retencyjnego. Ze względu na sposób wytwarzania wkłady koronowo-korzeniowe można podzielić na wkłady indywidualne odlewane oraz wkłady prefabrykowane [4,5].

W przypadku wkładów prefabrykowanych skuteczność rehabilitacji protetycznej jest w równym stopniu zależna od postaci konstrukcyjnej wkładu koronowo-korzeniowego i materiału, z którego został on wykonany oraz rodzaju zastosowanego cementu. Na rynku dostępnych jest wiele rodzajów postaci konstrukcyjnych wkładów koronowo-korzeniowych i cementów stomatologicznych. Do analizy wytypowano wkład Flexi-Post. Wkład ten charakteryzuje się dużą retencją w kanale korzeniowym oraz małym naciskiem na ścianę korzenia. Aby ułatwić wybór odpowiedniego rodzaju cementu, przeprowadzono analizę numeryczną układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb z wykorzystaniem trzech różnych cementów stomatologicznych.

W literaturze niewiele miejsca poświęca się zagadnieniu biomechanicznemu układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb z uwzględnieniem stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń. Dotychczas przeprowadzone analizy uwzględniają uproszczone modele układów wkład – ząb. Niewiele z nich zawiera analizy uwzględniające różne rodzaje cementów stomatologicznych [6-11]. Z tego względu celem przeprowadzonej analizy było określenie wpływu zastosowanego rodzaju cementu w układzie wkład koronowo-korzeniowy - ząb.

Celem przeprowadzonej analizy numerycznej było wyznaczenie stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. Tego rodzaju analiza jest podstawą do optymalizacji zarówno cech geometrycznych implantu, jak i własności mechanicznych biomateriału. Niniejsza praca stanowi fragment badań prowadzonych przez autorów dotyczących poprawy własności użytkowych wkładów koronowo-korzeniowych stosowanych w protetyce stomatologicznej [12].

Materiały i metody

Analizie poddano wkład koronowo-korzeniowy Flexi-Post firmy Essential Dental Systems o rozmiarze nr 2, wykonany ze stopu tytanu – RYS. 1a. W pierwszym etapie pracy wykonano model geometryczny wkładu k-k – RYS. 1b.

Introduction

The one of the problems in conservative dentistry is the destruction of tooth crowns with the simultaneous occurrence of the inflamed pulp. In clinical practice, these teeth are treated endodontically. After the treatment the tooth becomes dead, does not have a pulp. However a healthy root is a natural implant that can be used for further restoration. Leaving cured and properly secured root's canal may avoid or minimize alveolar bone loss. A post-and-core is a type of monosegmental dental restoration that is utilized when there is inadequate tooth structure remaining to support a traditional restoration. Posts-and-cores are usually made of metallic alloy, which increase the fill's retention and at the same time should retain physiological transfer way of stresses exerted during mastication [2,3]. The endodontic posts consist of the crown part which is a substitute for damaged tissue of tooth and root part which is embedded in the tooth canal. Because of the fabrication method these restorations can be divided into individual cast and prefabricated posts [4,5].

In the case of prefabricated posts the effectiveness of prosthetic rehabilitation equally depends on its geometric form and material, from which it was made, and on the type of used cement. There are many types of dental post-and-cores and dental cements commercially available. The Flexi-Post was selected to realize research. This post has high retention in the root canal and small emphasis on the root wall. In order to facilitate the selection of optimal cement, numerical analysis of the dental post-and-core – tooth system (for three variants of dental cements) was carried out.

Little attention has been devoted in the literature on a post-and-core – tooth system biomechanical issues taking into account displacements, strains and stress state. To date, taken analyses include simplified models of post-and-core – tooth system. Few of them contain analysis including different types of dental cements [6-11]. For this reason, the aim of the work was to determine effects of the type of cement used in the post-and-core – tooth system. Displacements, strains and stresses have been designated in the analysis.

This kind of analysis is the basis to optimization both the characteristics of geometry of the implant and the mechanical properties of the biomaterial. This work is a part of research carried out by the authors concerning improvement of functional properties of endodontic posts used in dental prosthetics [12].

Materials and methods

Flexi-Post from Essential Dental Systems, Inc.; (Size 2), made of titanium alloy was analyzed in the work – FIG. 1a. In the first stage the post-and-core geometrical model was created – FIG. 1b.

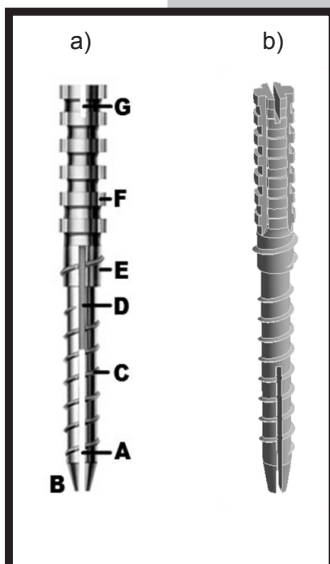
The geometrical model of a tooth was modeled, maintaining its actual dimensions – FIG. 2. The lower right canine model with fully reconstructed crown was analyzed. Subsequently model of post-and-core – tooth system was developed. In the root's canal – the hole filled with cement was simulated – combining the post with the tooth root. At the apex of the tooth root, 5 mm gutta-percha filling was simulated. In the canal the post was inserted. To the coronal part of post-and-core a composite material (rebuilding tooth stump) was applied. The next step was to simulate the crown imposed on the tooth stump. Around the periodontal tooth root with a thickness of about 0.2 mm was modelled. Geometrical models of analyzed system were created in Autodesk Inventor – FIG. 2.

W kolejnym etapie pracy wykonano model geometryczny zęba, zachowując jego rzeczywiste wymiary – RYS. 2. Analizie poddano model kła dolnego prawego z całkowicie odbudowaną koroną. W dalszej kolejności opracowano model układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb. W kanale korzenia zęba zasymulowano otwór wypełniony cementem, łączącym wkład z korzeniem zęba, natomiast przy wierzchołku korzenia zęba zasymulowano 5 mm wypełnienia gutaperką. W tak przygotowany kanał wprowadzono wkład. Natomiast na koronową część wkładu koronowo-korzeniowego nałożono materiał kompozytowy odbudowujący kikut zęba. Kolejnym krokiem było zasymulowanie korony nałożonej na kikucie. Wokół korzenia zęba zamodelowano ozębnią o grubości ok 0,2 mm. Modele geometryczne elementów analizowanego układu wykonano w programie Inventor – RYS. 2.

Dla tak opracowanych modeli geometrycznych wygenerowano siatkę do obliczeń metodą elementów skończonych. Do dyskretyzacji elementów analizowanego układu wykorzystano oprogramowanie ANSYS Workbench v13 – RYS. 3. Dla przeprowadzenia obliczeń niezbędne było określenie i nadanie warunków początkowych oraz brzegowych, które z odpowiednią dokładnością odwzorowywały zjawiska zachodzące w układzie rzeczywistym. Przyjęto następujące założenia:

- koronę obciążono siłą $F = 300$ N przyłożoną na brzegu siecznym oraz na ok. 1/3 powierzchni wargowej osiowo wzdłuż osi zęba,
- umiejscowienie podpory uniemożliwiało ruch ozębnej w kierunku osi X, Y i Z.

W obliczeniach numerycznych uwzględniono dane materiałowe składowych modelu dostępne w piśmiennictwie fachowym oraz w materiałach producentów (TABELA 1).

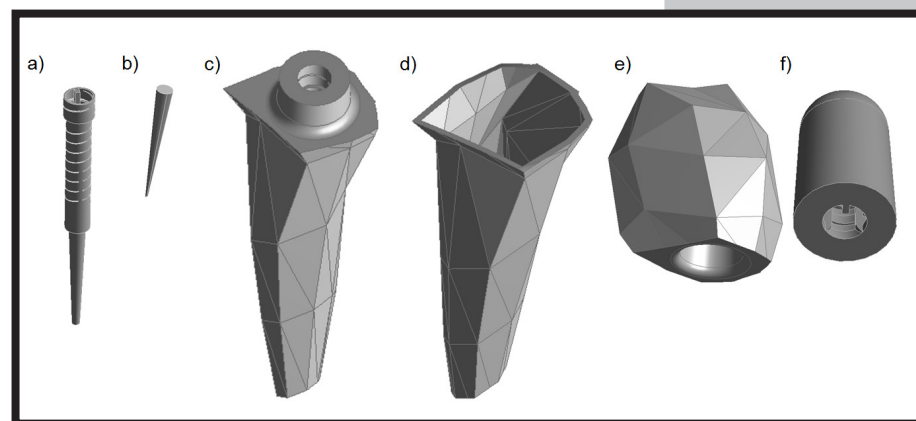


RYS. 1. Postać konstrukcyjna wkładu koronowo-korzeniowego Flexi-Post [13]: a) rzeczywista, b) geometryczna; A – unikalna konstrukcja rozciętego trzonu wkładu, B – stożkowate zakończenie ramion wkładu, C – równoległościenny ostry gwint, D – kanał wentylacyjny wkładu, E – II stopień trzonu, F – równoległe bruzdy w części koronowej, G – rowek dla klucza wewnętrznego.
FIG. 1. Construction of Flexi-Post [13]: a) the actual, b) geometrical; A – patented split-shank design, B – tapered end of the post-and-core arm, C – parallel sided sharp threads, D – entire length of shank is vented, E – second tier, F – highly retentive head, G – groove for the internal key.

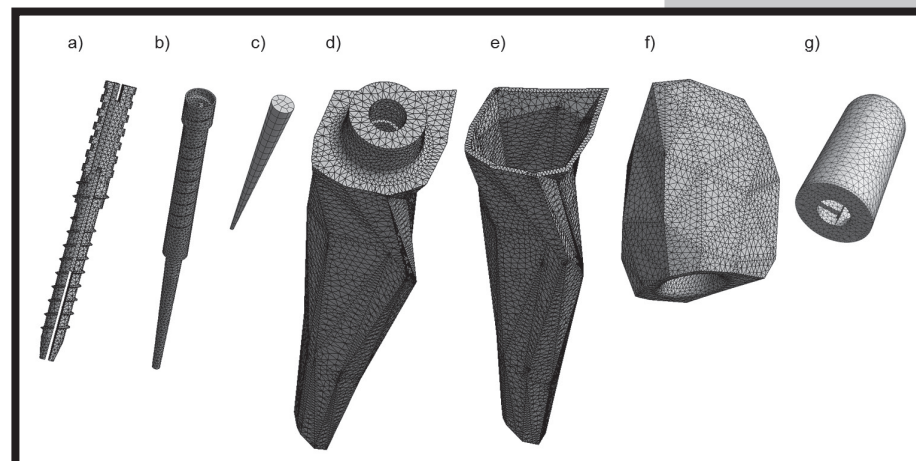
On the basis of the geometrical models, finite element meshes were generated. Numerical models were prepared in ANSYS Workbench v13 – FIG. 3. In order to carry out calculations it was necessary to evaluate and establish initial and boundary conditions which imitate phenomena in real system with appropriate accuracy. The following assumptions were established:

- crown was loaded with force $F = 300$ N exerted on the incisal end and approximately 1/3 labial surface axially along post-and-core,
- the positioning of the support prevented the periodontium movement in the direction of X, Y and Z axis.

The numerical calculation taken into account material data of model components available in a professional literature and manufacturers' data (TABLE 1).



RYS. 2. Model geometryczny: a) cementu, b) gutaperki, c) korzenia, d) ozębnej, e) korony, f) odbudowy kikuta
FIG. 2. Geometrical model of: a) cement, b) gutta-percha, c) root, d) periodontium, e) crown, f) reconstruction of the stump.



RYS. 3. Model zdyskretyzowany: a) wkładu koronowo-korzeniowego, b) cementu, c) gutaperki, d) korzenia, e) ozębnej, f) korony, g) odbudowy kikuta.
FIG. 3. Discretized model of: a) dental post-and-core, b) cement, c) gutta-percha, d) root, e) periodontium, f) dental crown, g) reconstruction of the stump.

TABELA 1. Dane materiałowe wykorzystane w obliczeniach.
TABLE 1. Material data used in the calculation.

	Moduł Younga Young's modulus [GPa]	Współczynnik Poissona Poisson's ratio
Wkład koronowo-korzeniowy (stop tytanu) Post-and-core (Titanium alloy)	110	0.31
Korzeń (Zębina) / Root (Dentine)	18.6	0.31
Korona (ceramika tlenku cyrkonu) Crown (Zirconium oxide ceramics)	210	0.30
Cement szklanojononmerowy [Wariant I] Glass ionomer cement [I Variant]	4	0.35
Cement kompozytowy Variolink (Ivoclar) [Wariant II] Variolink composite cement (Ivoclar) [II Variant]	8.3	0.35
Cement fosforanowo-cynkowy [Wariant III] Zinc-phosphate cement [III Variant]	22.4	0.35
Odbudowa kikuta (kompozyt Ti-Core Natural) Reconstruction of the stump (Ti-Core Natural composite)	22.2	0.30
Gutaperka / Gutta-percha	0.00069	0.45
Ozębna / Periodontium	0.0689	0.45

TABELA 2. Wyniki analizy numerycznej – wariant I (cement szklanojononmerowy).
TABLE 2. The results of the numerical analysis – I variant (glassjonomer cement).

	Elementy układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb Elements of the post-and-core – tooth system						
	Wkład k-k Post-and-core	Korzeń Root	Ozębna Periodontium	Korona Crown	Cement	Gutaperka Gutta-percha	Odbudowa kikuta Reconstruction of the stump
Przemieszczenia całkowite Total displacement, mm	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.005	0.02
Odształcenia zredukowane Equivalent strain $\epsilon_{\max}$, %	0.05	0.2	6	0.01	0.1	0.02	0.02
Naprężenia zredukowane Equivalent stress $\sigma_{\max}$, MPa	65	34	5	25	5	0.03	5
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xy} , MPa	15	7	1	6	2	0.01	1
Naprężenia styczne Shear stress τ_{yz} , MPa	8	4	1	4	2	-	2
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xz} , MPa	8	2	0.5	4	1	0.007	0.5

TABELA 3. Wyniki analizy numerycznej – wariant II (cement kompozytowy Variolink).
TABLE 3. The results of the numerical analysis – II variant (composite cement Variolink).

	Elementy układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb Elements of the post-and-core – tooth system						
	Wkład k-k Post-and-core	Korzeń Root	Ozębna Periodontium	Korona Crown	Cement	Gutaperka Gutta-percha	Odbudowa kikuta Reconstruction of the stump
Przemieszczenia całkowite Total displacement, mm	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.005	0.02
Odształcenia zredukowane Equivalent strain $\epsilon_{\max}$, %	0.05	0.18	6	0.01	0.08	0.02	0.02
Naprężenia zredukowane Equivalent stress $\sigma_{\max}$, MPa	65	34	5	25	7	0.03	5
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xy} , MPa	12	7	1	6	3	0.01	1
Naprężenia styczne Shear stress τ_{yz} , MPa	6	4	1	4	2	0.009	2
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xz} , MPa	6	2	0.5	4	1	0.01	0.5

TABELA 4. Wyniki analizy numerycznej – wariant III (cement fosforanowo-cynkowy).
TABLE 4. The results of the numerical analysis – III variant (zinc-phosphate cement).

	Elementy układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb Elements of the post-and-core – tooth system						
	Wkład k-k Post-and-core	Korzeń Root	Ozębna Periodontium	Korona Crown	Cement	Gutaperka Gutta-percha	Odbudowa kikuta Reconstruction of the stump
Przemieszczenia całkowite Total displacement, mm	0.02	0.01	0.01	0.03	0.01	0.005	0.02
Odształcenia zredukowane Equivalent strain $\varepsilon_{\max}$, %	0.05	0.18	6	0.01	0.07	0.02	0.02
Naprężenia zredukowane Equivalent stress $\sigma_{\max}$, MPa	65	33	5	25	17	0.03	4
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xy} , MPa	9	7	1	6	4	0.001	1
Naprężenia styczne Shear stress τ_{yz} , MPa	5	4	1	4	2	0.004	2
Naprężenia styczne Shear stress τ_{xz} , MPa	4	2	0.5	4	1	0.007	0.5

Wyniki

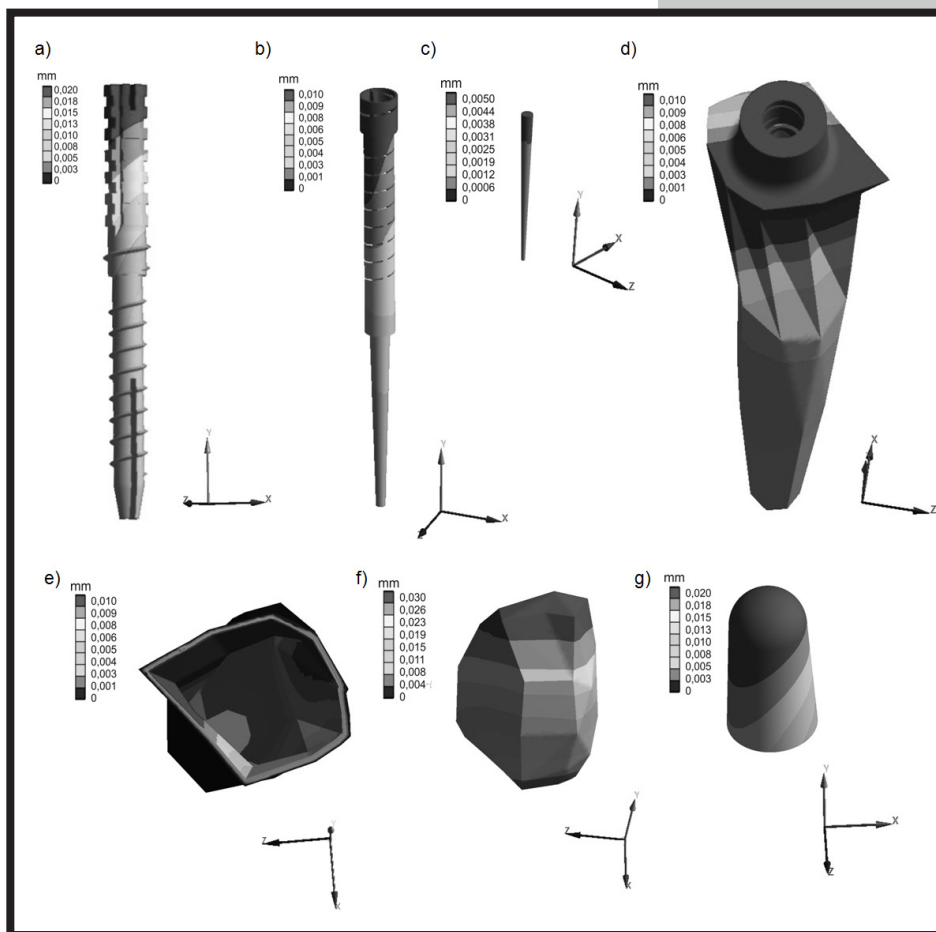
Wyniki analizy stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb przedstawiono w TABELACH 2-4. Natomiast na RYS. 4-6 przedstawiono przykładowe wyniki stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń (wariant II).

Analiza uzyskanych wyników wskazuje na zróżnicowany rozkład wartości przemieszczeń, odkształceń i naprężeń w elementach analizowanego układu. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że niezależnie od zastosowanego cementu największe przemieszczenia występują w koronie i zlokalizowane były na powierzchni siecznej zęba, gdzie ich wartość maksymalna wynosiła 0,03 mm – RYS. 4. Uzyskane wartości przemieszczeń całkowitych są znikome i świadczą o stabilności i odpowiedniej sztywności analizowanego układu. We wszystkich przypadkach największe wartości odkształceń $\varepsilon_{\max} = 6\%$ zlokalizowane były w ozębnej w części przykoronowej oraz korzeniowej od strony językowej. Ich wartość nie zmieniała się wraz ze zmianą zastosowanego cementu stomatologicznego – RYS. 5. Z kolei maksymalne naprężenia zredukowane $\sigma_{\max} = 65$ MPa we wszystkich przypadkach występowały we wkładzie koronowo-korzeniowym w środkowej części korzeniowej od strony językowej – RYS. 6. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono również zróżnicowane wartości naprężeń zredukowanych dla badanych cementów. Zaobserwowano, że największe wartości naprężeń zredukowanych występowały w przypadku zastosowania cementu fosforanowo-cynkowego. Wartość ta wynosiła $\sigma_{\max} = 17$ MPa i zlokalizowana była po stronie kontaktującej się z korzeniem. Dodatkowo zaobserwowano nieznaczne różnice w wartościach naprężeń stycznych dla analizowanych cementów stomatologicznych.

Results

The results of analysis of displacements, strains and stresses in each element of the post-and-core system are presented in TABLES 2-4. In FIGS. 4-6 examples of the results of the displacements, strains and stresses (II variant) are shown.

Analysis of the obtained results points on diverse distribution of the displacements, strains and stresses in each elements of the system. On the basis of the analysis it can be noticed that the maximal displacements are localized in crown (in incisal tooth surface) regardless of the applied cement. The maximal value of displacement was equal to 0.03 mm – FIG. 4. Obtained values of total displacements were minimal, what provides the adequate stability and stiffness of the analyzed system. In all cases, maximal strain values were $\varepsilon_{\max} = 6\%$, and were localized in periodontal membrane (in crown and root part, near tongue). Strains in the periodontal membrane remain unchanged for all applied cements – FIG. 5. On the other hand, the maximal values of the equivalent stress for all considered variants were localized in post-and-core, near tongue, and were equal to $\sigma_{\max} = 65$ MPa – FIG. 6. Based on the analysis various values of equivalent stress for tested cements were also noticed. The highest values of the equivalent stresses were observed for zinc-phosphate cement. The value was equal to $\sigma_{\max} = 17$ MPa and was localized on the side in contact with root. In addition, slight differences of the shear stresses for analyzed dental cement were observed.

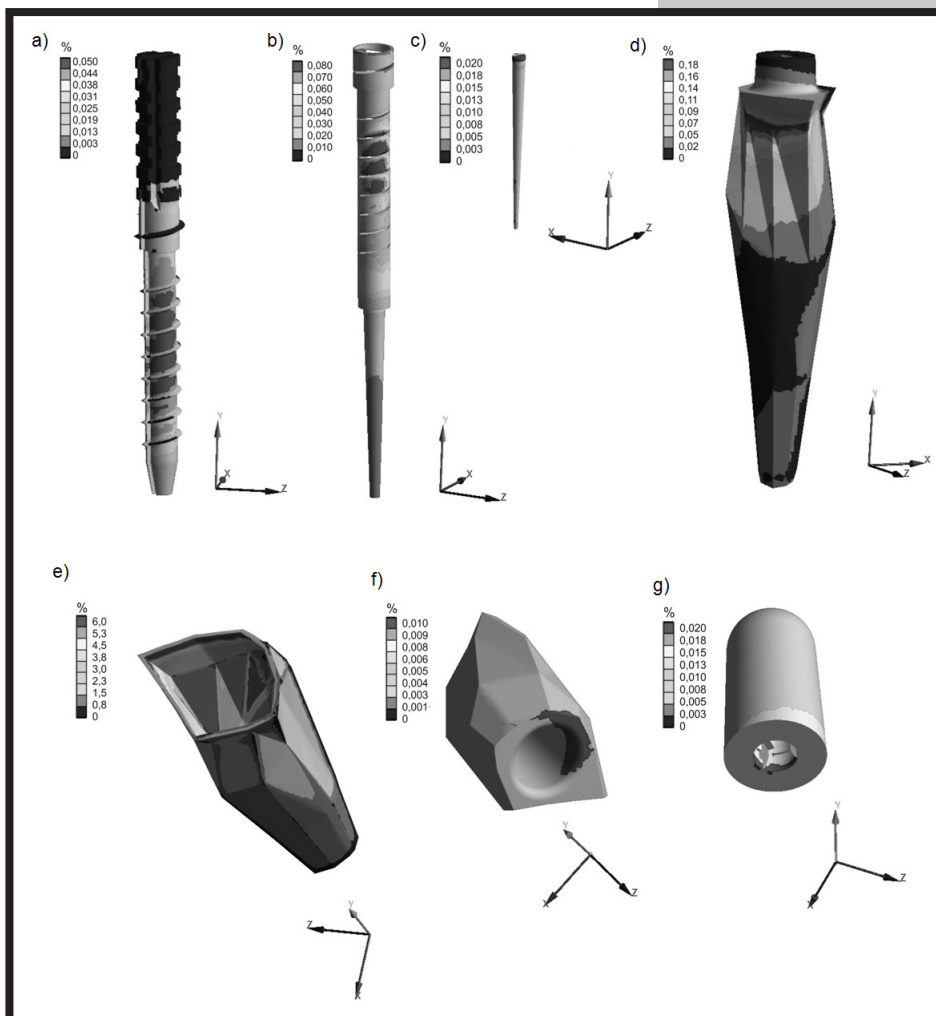


RYS. 4. Przykładowe wyniki stanu przemieszczeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb (wariant II):

a) wkład koronowo-korzeniowy,
b) cement,
c) gutaperka,
d) korzeń,
e) ozębna,
f) korona,
g) odbudowa kikuta.

FIG. 4. An example of the results of the displacements in elements of the post-and-core – tooth system (II variant):

a) post-and-core,
b) cement,
c) gutta-percha,
d) root,
e) periodontium,
f) crown,
g) reconstruction of the stump.

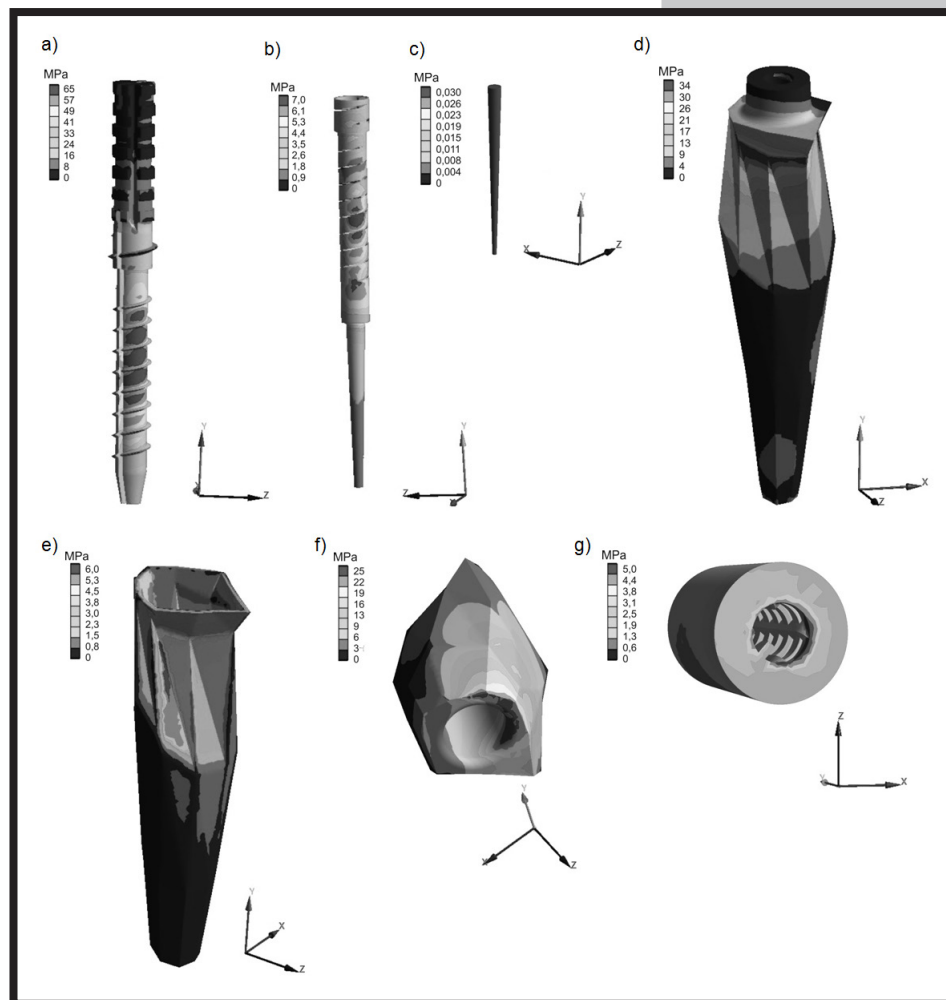


RYS. 5. Przykładowe wyniki stanu odkształceń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb (wariant II):

a) wkład koronowo-korzeniowy,
b) cement,
c) gutaperka,
d) korzeń,
e) ozębna,
f) korona,
g) odbudowa kikuta.

FIG. 5. An example of the results of the strains in elements of the post-and-core – tooth system (II variant):

a) post-and-core,
b) cement,
c) gutta-percha,
d) root,
e) periodontium,
f) crown,
g) reconstruction of the stump.



RYS. 6. Przykładowe wyniki stanu naprężeń w elementach układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb (wariant II):

a) wkład koronowo-korzeniowy,
b) cement,
c) gutaperka,
d) korzeń,
e) ozębna,
f) korona,
g) odbudowa kikuta.

FIG. 6. An example of the results of the stresses in elements of the post-and-core – tooth system (II variant):

a) post-and-core,
b) cement,
c) gutta-percha,
d) root,
e) periodontium,
f) crown,
g) reconstruction of the stump.

Dyskusja i Wnioski

Głównym celem zrealizowanej pracy było określenie wpływu zastosowanego cementu na własności użytkowe analizowanego wkładu koronowo-korzeniowego. W literaturze trudno znaleźć modele wykonane i obciążone w ten sam sposób. W związku z tym porównania wyników otrzymywanych przez różnych badaczy są w pewnym stopniu ograniczone. Rodzaj zastosowanego cementu, wielkość stosowanej siły oraz miejsce i kąt jej przyłożenia bywają różne [6-12,14-16]. Podobne badania prowadziła Magdalena Tańska i zespół [8], których celem było porównanie poziomów naprężeń w wybranych wkładach w zależności od rodzaju zastosowanego cementu. Do badań wytypowała wkład z tytanu, oraz włókna szklanego obciążony siłą 50 N przyłożoną pod kątem 45° przy brzegu siecznym. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziła, że użycie cementu kompozytowego skutkowało obniżeniem się naprężeń o ok. 40% w stosunku do cementu fosforanowego. Z kolei badania realizowane przez Oguza Ersalana [14] z zespołem, wykazały konieczność stosowania cementu fosforanowego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzili, iż w przypadku zastosowania wkładu tytanowego najlepsze własności uzyskuje się gdy zastosowano cement o wyższym module sprężystości. Jak można zauważyć wyniki tych badań są zróżnicowane, a zatem ta kwestia nie jest jeszcze w pełni rozwiązana. Dlatego też autorzy pracy podjęli się przeprowadzenia analizy numerycznej aby jednoznacznie określić wpływ rodzaju cementu na pracę układu wkład koronowo-korzeniowy – ząb.

Discussion and Conclusions

The major aim of the study was to determine the influence of applied dental cement for functional properties of the analyzed post-and-core. It's difficult to find a similar models that applied in the same way as in the presented studies thus the possibility of comparison results provided by various authors is limited. Type of applied cement, size of applied force and location of its application could be different [6-12,14-16]. The similar researches were presented by Tańska et al. [8]. Their aim was to compare the stress levels in selected posts, depending on the applied dental cement. The post made of titanium and fiberglass loaded with the force of 50 N at an angle 45° at the incisal was selected for research purposes. Based on the results of research it was found that application of the composite cement resulted in lowering of stresses (about 40%) in comparison with phosphate cement [8]. On the other hand, research by Oguza Ersalana et al. [14] showed the need to use phosphate cement. On the basis of their results, it was stated that the best properties were for titanium post with the use of higher elasticity module cement. As may be noted, these results are very diverse, so that the problem remains unsolved. For that reason, the authors undertook to carry out numerical analysis to unambiguously determine the effect of the type of the cement for the work of the post-and-core – tooth system.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że największe wartości naprężeń zredukowanych występują w przypadku zastosowania cementu fosforanowo-cynkowego, gdzie wartość ta była 3-krotnie większa w porównaniu do cementu szklanojononowego oraz kompozytowego – TABELA 2-4. Jest to potwierdzeniem wyników uzyskanych w badaniach przeprowadzonych przez Tańską i zespół [8]. Dodatkowo nie stwierdzono istotnego wpływu zastosowanego cementu na pozostałe elementy analizowanego układu wkład-ząb. Niezależnie od rozpatrywanego wariantu zastosowanego cementu dentystrycznego, uzyskane w analizie wartości naprężeń zredukowanych dla wkładu koronowo-korzeniowego nie przekroczyły wartości granicy plastyczności biomateriału metalowego ($R_{p0.2} = 780 \text{ MPa}$), co gwarantuje odkształcenie wkładu w zakresie sprężystym. Dodatkowo stwierdzono również, że uzyskane wartości naprężeń w pozostałych elementach analizowanego układu nie przekraczały wartości ich wytrzymałości na ściskanie. Uzyskane wyniki wskazują, że analizowany wkład koronowo-korzeniowy charakteryzuje się dużą retencją w kanale korzeniowym oraz małym naciskiem na ścianę korzenia niezależnie od rodzaju zastosowanego cementu.

Kolejne etapy badań obejmować będą analizę numeryczną również innych postaci wkładów koronowo-korzeniowych z uwzględnieniem zjawisk zachodzących w układzie stomatognatycznym (np. bruksizm). Dodatkowo zamodelowana zostanie kość gąbczasta oraz korowa o cechach geometrycznych odzwierciedlających rzeczywiste wymiary występujące w żuchwie ludzkiej. W dalszej kolejności przeprowadzone będą badania doświadczalne. Tak kompleksowe opracowanie będzie stanowić cenne źródło informacji dla stomatologów.

Podziękowania

Praca była finansowana ze środków na działalność statutową dla Wydziału Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej.

On the basis of the results, it was found that the maximal values of equivalent stresses were observed when zinc-phosphate cement was applied. That value was three times higher in comparison to glass ionomer cement and composite cement – TABLES. 2-4. This confirms the results obtained in a study conducted by Tańska et al. [8]. In addition there was no significant influence of applied cement on other parts of post-and-core – tooth system. The values of the equivalent stresses in post-and-core did not exceed the yield strength of the metallic biomaterial ($R_{p0.2} = 780 \text{ MPa}$), regardless of the applied dental cement. This guarantees deformations of the post-and-core in the elastic range. Moreover, it was found that values of the equivalent stresses observed in the other components of analyzed system did not exceed their compressive strength. The results of the analysis shown that post-and-core is characterized by substantial retention in root and low pressure at the wall of the root, regardless of applied dental cement.

Further studies will cover numerical analysis of other forms of post-and-core, taking into account phenomena occurring stomatognathic system (e.g. bruxism). In addition, cortical bone and cancellous bone reflecting the actual dimension of the human mandible will be modeled. In the next step experimental research will be carried out. Such comprehensive study will be valuable source of knowledge for dentists.

Acknowledgements

The work was financed from resources assigned to the statutory activity of the Faculty of Biomedical Engineering, Silesian University of Technology.

Piśmiennictwo

- [1] Szczyrek P., Zadroga K., Mierzwińska-Nastalska E.: Cementing of porcelain restorations – review of the literature. Part I, Protetyka Stomatologiczna (2008) LVIII, 4, 279-283.
- [2] Spiechowicz E.: Protetyka stomatologiczna. Podręcznik dla studentów, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2010.
- [3] Milewski G.: Wytrzymałościowe aspekty interakcji biomechanicznej tkanki twarda – implant w stomatologii, Zeszyty Naukowe Politechniki Krakowskiej, Mechanika nr 89, Kraków 2002.
- [4] Zielińska R., Dejak B., Suchorzewski A.: Porównanie własności zębów odbudowanych wkładami koronowo-korzeniowymi lanymi i standardowymi kompozytowymi wzmocnionymi włóknami szklanymi na podstawie piśmiennictwa, Protetyka Stomatologiczna (2010) LX, 1, 37-43.
- [5] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A., Biomateriały w stomatologii, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2008
- [6] Mattos C. M. A., Las Casas E. B., Dutra I. G. R., Sousa H. A., Guerra S. M. G.: Numerical analysis of the biomechanical behaviour of a weakened root after adhesive reconstruction and post-core rehabilitation, Journal of Dentistry 40 (2012) 423-432.
- [7] Dejak B.: Comparison of the strength of teeth restored by individual cast dowels and prefabricated fiberglass-reinforced composite posts, Protetyka Stomatologiczna (2010) LX, 2, 112-123.
- [8] Tańska M., Wyciślik P., Mierzwińska-Nastalska E.: Comparison of stress levels related to cement elasticity in selected standard posts cemented in teeth models: Computer simulations, Protetyka Stomatologiczna (2010) LX, 4, 260-266.

References

- [9] Dobosz A., Panek H., Napadłek P.: Implementation of Numerical Analysis in Assessment of Stresses in Hard Tissues of Teeth Reconstructed with Selected Fixed Protheseses, Dental and Medical Problems (2005) 42, 4, 657-662.
- [10] Pérez-González A., González-Lluch C., Sancho-Bru J. L., Rodríguez-Cervantes P. J., Iserre-Vilar J. L.: Biomechanical Models of Endodontic Restorations, Theoretical Biomechanics, Dr Vaclav Klika (Ed.), 2011.
- [11] de CastroAlbuquerque R., Polleto L. T., Fontana R. H., Cimini C. A., Stress analysis of an upper central incisor restored with different posts, Journal of Oral Rehabilitation (2003) September, 30, 9, 936-943.
- [12] Loska S., Paszenda Z., Basiaga M., Kajzer W.: Analiza numeryczna wkładu koronowo-korzeniowego z wykorzystaniem metody elementów skończonych w: L. Leniowska, Z. Nawrat: Postępy Inżynierii Biomedycznej, Rzeszów, 2013.
- [13] Katalog firmowy - Essental Dental Systems.
- [14] Eraslan O., Aykent F., Yücel M. T., Akman S.: The finite element analysis of the effect of ferrule height on stress distribution at post-and-core-restored all-ceramic anterior crowns, Clinical Oral Investigations (2009) 13, 223-227.
- [15] Coelho C. S., Biffi J. C., Silva G. R., Abrahao A., Campos R. E., Soares C. J.: Finite element analysis of weakened roots restored with composite resin and post. Dental Materials Journal (2009) 28, 6, 671-678.
- [16] Garbin C. A., Spazzin A. O., Meira-Júnior A. D., Loretto S. C., Lyra A. M. V. C., Braz R.: Biomechanical behavior of a fractured maxillary incisor restored with direct composite resin only or with different post systems, International Endodontic Journal (2010) 43, 12, 1098-1107.

ELEKTROCHEMICZNA DETEKCJA INTERLEUKINY-6 NA PODŁOŻU NANOTUBULARNYM DITLENKU TYTANU

KATARZYNA ARKUSZ*, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA,
ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK*

ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
UNIwersytet Zielonogórski,
UL. Licealna 9, 65-417 Zielona Góra

* E-MAIL: K.ARKUSZ@IBEM.UZ.ZGORA.PL,

E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było opracowanie elektrochemicznych biosensorów do wykrywania obecności prozapalnej cytokiny, interleukiny 6 (IL-6), w roztworze soli fizjologicznej buforowanej fosforanami (phosphate buffered saline PBS). Do tego celu wykorzystano nowe, modyfikowane powierzchniowo warstwy nanorurek ditlenku tytanu (TNT - titania nanotubes) wytworzone w procesie anodowania folii tytanu w roztworze glikolu etylenowego. Warstwy TNT poddano obróbce termicznej poprzez wyżarzanie w atmosferze argonu i funkcjonalizowano przez bezpośrednią immobilizację przeciwciał cytokiny IL-6 na ich powierzchni metodą nakrapiania. Oznaczenie stężenia IL-6 w roztworze PBS badano za pomocą dwóch typów biosensorów elektrochemicznych: impedancyjnego i amperometrycznego, wykorzystując oddziaływanie pomiędzy ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IL-6 i antygenem IL-6. Działanie biosensora impedancyjnego polegało na określeniu zmian wartości pojemności elektrycznej warstwy powierzchniowej (a równocześnie kąta przesunięcia fazowego jej charakterystyki impedancyjnej) na skutek powstawania kompleksu antygen-przeciwciało IL-6. Do wykrywania antygenu IL-6 w biosensorze amperometrycznym zastosowano natomiast przeciwciało IL-6 skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HRP). Limity detekcji IL-6 opracowanych biosensorów wynoszące 5 pg/ml są znacznie niższe od limitu detekcji w obecnie stosowanych testach immunoenzymatycznych ELISA (25 pg/ml). Zarówno korzystne właściwości adsorpcyjne i dobre przewodnictwo elektryczne materiału podłoża biosensorów, umożliwiające zastosowanie bezpośredniej immobilizacji substancji biologicznych, jak i stosowane dwie metody elektrochemiczne: impedancyjna oraz amperometryczna sprawiają, że opracowana metoda detekcji cytokin jest szybka, tania, selektywna i czuła.

Słowa kluczowe: nanorurki ditlenku tytanu, IL-6, biosensor elektrochemiczny

[Inżynieria Biomateriałów 125 (2014) 21-29]

ELECTROCHEMICAL DETECTION METHOD FOR INTERLEUKIN-6 ON TITANIA NANOTUBE PLATFORMS

KATARZYNA ARKUSZ*, MARTA NYCZ, EWA PARADOWSKA,
ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK*

BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION,
UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA,
LICEALNA 9, 65-417 ZIELONA GÓRA, POLAND

* E-MAIL: K.ARKUSZ@IBEM.UZ.ZGORA.PL,

E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

Abstract

Sensitive electrochemical biosensors for determination of proinflammatory cytokine Interleukin-6 are elaborated. They are based on novel and surface modified layers of titania nanotubes (TNT) formed by anodization of titanium foil in ethylene glycol solution. The TNT layers were thermally improved by annealing in argon and functionalized for biosensing by direct immobilization of biological reagents on their surfaces with the simple drop technique. Strong antibody-antigen interaction was used in two types of electrochemical biosensors: the impedimetric and the amperometric to detect the IL-6 concentrations in phosphate buffered solutions (PBS). The impedimetric biosensor determines changes of capacitance values due to the formation of IL-6 antibody-antigen complex on biosensor platform. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibodies are used to detect IL-6 antigen in the amperometric biosensor. Two novel electrochemical methods allow to detect 5 pg/ml of IL-6 in PBS solution, which is below detection limit 25 pg/ml in currently used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. The favorable adsorption and electrical conductance properties of the platform material, which allow the direct immobilization of biological substances on its surface and give the possibility to apply two electrochemical techniques: the impedimetric and the amperometric one, ensure the elaborated cytokine detection methods to be fast, inexpensive, selective and sensitive.

Keywords: titania nanotubes, IL-6, electrochemical biosensor

[Engineering of Biomaterials 125 (2014) 21-29]

Poszukiwanie nowych sposobów immobilizacji oraz materiałów matryc ma kluczowe znaczenie dla rozwoju nowych typów biosensorów. Badania biosensorów stosowanych w technologii żywności, inżynierii genetycznej i ochronie środowiska [1-3] wskazują, że oddziaływanie pomiędzy warstwą a elementem biologicznym czujnika wpływa szczególnie na jego najbardziej pożądane cechy - selektywność i czułość. Detekcja jest zazwyczaj oparta na interakcji: przeciwciało-antygen, lektyna-glikoproteina i hormon-receptor. Jeżeli takiemu oddziaływaniu towarzyszy obecność centrum redoks, to jego występowanie może być odzwierciedlone ilościowo poprzez zmianę prądu elektrycznego w reakcji elektrochemicznej [4,5].

W prezentowanych badaniach wykorzystanie elektrody z warstwą nanorurek tlenku tytanu umożliwiło opracowanie czułego i jednocześnie prostego immunobiosensora, łatwego w użyciu w ośrodkach diagnostyki medycznej.

Liczne prace badawcze [6-8] wskazują na zwiększoną ekspresję interleukiny 6 (IL-6) i/lub jej receptorów krwiotwórczych w metabolizmie kości, chorobach zapalnych, patologii i progresji nowotworu. W szczególności, wzrost jej stężenia obserwuje się w przypadkach nowotworu macicy, płuc, okrężnicy, nerek, piersi i jajników. Zwykle jej poziom jest skorelowany z wielkością guza i jego rozmieszczeniem [7-8]. To sugeruje, że IL-6 może funkcjonować jako ważny czynnik regulujący w obrębie mikrośrodowiska stanu zapalnego. W związku z powyższym, ekspresja IL-6 koreluje z angiogenezą, podczas szoku septycznego i przerzutów nowotworów.

Obecne metody wykrywania IL-6 są oparte na teście ELISA. W ostatnim czasie, badacze [9-13] zaproponowali nowe metody wykrywania IL-6 z zastosowaniem biosensorów opartych na różnych podłożach (np. powierzchnia ZnO/SiO₂/Si, 3-aminopropylomodyfikowane szkło porowate, wielofunkcyjne nanopory). Chociaż osiągnięto szeroki zakres wykrywania IL-6 (0,01 fg/ml ÷ 1000 pg/ml), to przy modyfikacji platform tych czujników biologicznych stosowano skomplikowane procesy unieruchomienia przeciwciała. Ponadto, wszystkie proponowane biosensory oparto na kosztownych metodach detekcji: optycznej i akustycznej, a w tych przypadkach samo przygotowanie próbek jest czasochłonne.

Warstwy TNT utworzone na folii tytanu po modyfikacji termicznej wykazują dostateczną przewodność elektryczną i odpowiednie właściwości adsorpcyjne wobec różnych cząsteczek biologicznych, dzięki czemu stanowią odpowiednie podłoże bioczułnika. Właściwości nanorurek tlenku tytanu: duża powierzchnia właściwa, wysoka bioaktywność in vitro [14], zdolność do kolonizacji bakterii [15] oraz immobilizowania enzymów i przeciwciał [16-19] czynią je szczególnie użytecznymi platformami do detekcji elektrochemicznej. Ponadto, wytwarzanie TNT przez anodowanie w roztworze kwasu ortofosforowego eliminuje tendencję biocząsteczek do rozwarstwiania, co często występuje na powierzchni materiałów aktywnych biologicznie. Poza tym ich ujemny potencjał stacjonarny w roztworze PBS (roztwór soli fizjologicznej buforowanej fosforanami) i SBF (sztuczny płyn fizjologiczny) umożliwiają bezpośrednie unieruchomienie kationowych składników biologicznych w wyniku zakłóceń elektrostatycznych. Nanorurki tlenku tytanu nie dezaktywują białek immobilizowanych na ich powierzchni [14], a właściwości warstwy mogą być modyfikowane poprzez wyżarzanie w kontrolowanej atmosferze, która polepsza przewodność i zwilżalność matrycy [20,21]. Niektórzy badacze [22-24] wykorzystujący Ti/TNT jako platformy biosensora uzyskują bardzo obiecujące rezultaty.

Introduction

The investigation of new methods of immobilization and application of novel materials are crucial in the development of new biosensors. Studies on new biosensors applied in food technology, biotechnology, genetic engineering and environmental control [1-3] revealed that the connection between the layer and the biological element of the sensor influences significantly its selectivity and sensitivity. Detection is usually based on antibody-antigen, lectin-glycoprotein or receptor-hormone interaction. If such interaction is accompanied by the presence of the redox center, its occurrence can be reflected quantitatively by a change of an electric current in an electrochemical reaction, being called shortly the electrochemical detection [4,5].

In present studies, we have developed a sensitive, and simple immunosensor to detect IL-6 cytokine using titanium dioxide nanotube-based nanoelectrode for easy use in point-of-care diagnostics.

Several works [6-8] showed recently the increased expression of interleukin 6 (IL-6) and/or its receptors in hematopoiesis, bone metabolism, inflammatory responses, pathogenesis and cancer progression. Particularly, the increased level of IL-6 is observed in uterus, lung, colon, kidney, breast and ovarian cancers. Usually its level is correlated with the tumor size and staging [7-8]. It suggests that IL-6 may function as a significant regulatory factor within the inflammatory microenvironment. Accordingly, IL-6 expression correlates with the angiogenesis, the course of septic shock and metastasis of tumors.

Current methods for detection of IL-6 are based on the ELISA tests. Recently, some authors [9-13] have proposed the detection of IL-6 with the use of biosensors based on different substrates (i.e. ZnO/SiO₂/Si surface, 3-aminopropylmodified controlled-pore glass, multifunctional nanoparticles). Although, the wide range of detection IL-6 (0.01 fg/ml ÷ 1000 pg/ml) was reached, the platforms of these biosensors were modified by difficult processes to immobilize antibodies. Moreover, all proposed biosensors were based on expensive detection methods: acoustic, optical, also time-consuming with regard to samples preparation.

TNT layers formed on titanium foil after thermal modification show sufficient electrical conductivity and appropriate adsorptive properties towards different biomolecules, making them ready Ti/TNT analytical systems for many types of biosensing. Properties of titania nanotubes: the high surface-to-volume ratio and bioactivity in vitro [14], the ability to colonize bacteria [15] and immobilize enzymes and antibodies [16-19], make them particularly useful platforms for electrochemical detection. Moreover, the fabrication of TNT by anodizing in phosphate solutions eliminates the tendency of biomolecules delamination that occurs prevalently in the bioactive coating of inorganic material. Their negative stationary potential in the PBS (phosphate buffered saline) and the SBF (simulated body fluid) solutions enable direct immobilization of cationic biological components due to electrostatic interference. Titania nanotubes do not inactivate proteins immobilized on their surface [14] and properties can be modified by annealing in controlled atmosphere, which improves conductivity and wettability [20,21]. Some works [22-24] on using Ti/TNT as the biosensor platforms are very promising.

Celem badań było opracowanie elektrochemicznej metody oznaczania prozapalnej cytokiny – Interleukiny 6 wykorzystując do tego modyfikowaną warstwę nanorurek tlenku tytanu, formowanych metodą anodowania na folii tytanowej. Warstwę TNT poddano modyfikacji cieplnej polegającej na wyżarzaniu w atmosferze argonu oraz funkcjonalizacji przez bezpośrednią immobilizację substancji biologicznych w celu uzyskania impedancyjnego i amperometrycznego sygnału odpowiedzi na obecność IL-6 o różnych stężeniach w roztworze PBS. W pracy podjęto próbę opracowania dwóch nowych, elektrochemicznych metod detekcji IL-6, charakteryzujących się niższym limitem detekcji niż stosowane obecnie testy ELISA oraz stanowiących prostą i tanią metodę analityczną.

Materialy i metody

Folia tytanowa (grubość 0,5 mm, czystość 99,99%), glikol etylenowy ($C_2H_6O_2$, czystość 99,8%), chlorek amonu (NH_4F , 99,5%), bufor fosforanowy (PBS, 0,01 M, pH 7,4) i peroksydaza chrzanowa (HRP, nr kat. 77332) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich (UK). Zestawy ELISA Kit IL-6 (ELH-IL6-001) nabyto w firmie RayBiotech (USA) i przechowywano w temperaturze 4°C w celu zabezpieczenia ich przed denaturacją. Do przygotowania matryc biosensorów zastosowano przeciwciała monoklonalne (MAb) interleukiny IL-6, w przypadku biosensora amperometrycznego także przeciwciała monoklonalne skoniugowane z HRP [25-27].

Wszystkie pomiary elektrochemiczne: anodowanie folii tytanowej, pomiar potencjału stacjonarnego (OCP), elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna (EIS), woltamperometria cykliczna (CV) prowadzono przy użyciu potencjostatu/galwanostatu AutoLab PGSTAT 302N (Eco Chemie, Utrecht, Holandia), wyposażonego w wzmacniacz napięcia (30V), w standardowym układzie trójelektrodowym, w którym elektrodę roboczą stanowiła próbka tytanu pokryta warstwą nanorurek Ti/TNT, elektrodę odniesienia - standardowa elektroda chlorosrebrowa $Ag/AgCl$ ($E_{Ag/AgCl} = 0,222$ V), a elektrodę pomocniczą - folia platyny. Badania prowadzono w temperaturze $25 \pm 2^\circ C$.

Przygotowanie warstw TNT

Warstwy TNT formowano poprzez anodowanie folii tytanowej w 85% roztworze glikolu etylenowego (50 ml), z dodatkiem 0,6% wag. NH_4F . Roztwory sporządzono z odczynników: glikol etylenowy, NH_4F i wody dejonizowanej, charakteryzujących się wysoką czystością. Parametry anodowania wyznaczono stosując model matematyczny [28] opracowany przez autorów, umożliwiający wytworzenie warstwy TNT o grubości 1000 ± 50 nm i średnicy 50 ± 5 nm. Uzyskane warstwy wyżarzano w atmosferze argonu w temperaturze $550^\circ C$ przez 2 godziny z szybkością narastania temperatury $30^\circ C/min$.

Pomiar potencjału stacjonarnego w obwodzie otwartym (OCP) Ti/TNT

Wyżarzane i niewyżarzane próbki Ti/TNT zanurzano w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) oraz wartości OPC mierzone w czasie 1800 sekund.

Funkcjonalizacja przygotowanej matrycy biosensora

Do immobilizacji przeciwciał L-6 na matrycy biosensora wykorzystano prostą metodę nakraplania. Modyfikowane termicznie próbki Ti/TNT inkubowano w 10 μl roztworu przeciwciał anti-IL-6 w czasie 30 minut, a następnie zanurzano w 10 μl roztworach antygenu IL-6 o różnych stężeniach, w zakresie od 0 do 2500 pg/ml. Pomiędzy etapami inkubacji próbki dokładnie przepłukiwano roztworem buforowym (3 $\times$ 100 μl) w celu usunięcia niezwiązanych lub związanych nieswoiście cząsteczek biologicznych.

In this work authors aimed at elaboration of the electrochemical method of determination the proinflammatory cytokine Interleukin-6 on surface modified layers of titania nanotubes (TNT) formed by anodization of titanium foil. Thermal improvement by annealing in argon and functionalization by simple immobilization of biological reagents have been applied to obtain the impedimetric and the amperometric response in order to evaluate the IL-6 concentrations in PBS solutions. Two novel electrochemical methods have been aimed at elaborating the electrochemical method to detect lower concentration of IL-6 than being obtained in currently used ELISA tests, by simple and cheap diagnostic method.

Materials and Methods

Titanium foil (thickness 0.5 mm, 99.99% trace metal basis), ethylene glycol ($C_2H_6O_2$, 99.8%), ammonium chloride (NH_4F , 99.5%), phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4) and horseradish peroxidase (HRP, no. 77332) were purchased from Sigma-Aldrich (UK). The ELISA kits for human IL-6 (ELH-IL6-001) protein were purchased from RayBiotech (USA) and stored at 4°C to eliminate any potential denaturation of the protein structures. The monoclonal (MAb) antibodies that make up the sandwich assay pair in the human Interleukin-6 (IL-6) were used in the detection scheme for impedimetric biosensor, whereas the monoclonal (MAb) IL-6 antibodies conjugated with HRP [25-27] were used in detection scheme for amperometric biosensor.

All electrochemical processes and measurements: the anodizing of titanium foil, the open circuit potential (OCP), recording and the electrochemical impedance spectroscopy (EIS) scans as well as the cyclic voltammetry (CV) tests were performed the AutoLab PGSTAT 302N potentiostat/galvanostat (Eco Chemie, Utrecht, the Netherlands), equipped with voltage multiplier (30 V) in the standard three-electrode configuration with titanium and Ti/TNT electrode as the working electrode, the standard $Ag/AgCl$ silver chloride electrode ($E_{Ag/AgCl} = 0.222$ V) as the reference electrode, and a platinum foil as the auxiliary electrode at $25 \pm 2^\circ C$.

Preparation of the TNT layers

TNT layers were formed by anodizing titanium foil in ethylene glycol solution with the addition of NH_4F . The foil was polarized up to 17 V and then kept at that potential in the same electrolyte for further 3750 s. Anodizing parameters were determined using the mathematical meta-model [28] elaborated by authors to obtain the TNT layer with thickness of 1000 ± 50 nm and TNTs diameter of 50 ± 5 nm. The obtained layers were annealed in argon at $550^\circ C$ for 2 h with the heating rate of $30^\circ C/min$ to the desired annealing temperature.

Evaluation of the open circuit potential (OCP) of Ti/TNT

The annealed and non-annealed the Ti/TNT samples were immersed in PBS solution (0.01 M, 50 ml, pH 7.4) and the OPC values were recorded for 1800 s.

Functionalization of TNT layers with IL-6

Simple drop coating method was used to immobilize the IL-6 cytokine on biosensor platform. Thermally modified Ti/TNT samples were incubated with 10 μl of anti-IL-6 standard solution for 30 min and then treated with 10 μl of IL-6 antigen solutions of various concentration ranging from 0 to 2500 pg/ml. Between incubation steps the samples were carefully washed-up with a buffer solution (3 $\times$ 100 μl) to remove unbound or non-specifically bound biomolecules. The whole immobilization procedure was carried at room temperature.

Skuteczność immobilizacji oceniano spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Całą procedurę immobilizacji przeprowadzono w temperaturze $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Analiza mikroskopowa warstw Ti/TNT

Analizę mikroskopową próbek wyżarzonych i nie modyfikowanych termicznie przeprowadzono przy użyciu Skaningowego Mikroskopu Elektronowego z Emisją Polową JEOL JSM 7600F.

Charakterystyka i pomiary elektrochemiczne

Odpowiedź opracowanego biosensora amperometrycznego sprawdzono metodą woltamperometrii cyklicznej w roztworze PBS (0.01 M, 10 ml, pH 7.4) w zakresie potencjału -0.8 ± 0.2 V vs. Ag/AgCl z szybkością skanowania 0.05 V/s. Odpowiedź biosensora impedancyjnego sprawdzono metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Elektrochemiczną analizę impedancyjną przeprowadzono w zakresie częstotliwości od 100 kHz do 0.1 Hz (10 punktów/dekadę), z zerowym potencjałem DC, amplitudą sygnału AC 10 mV oraz czasem zdwojenia 10 s.

Wyniki i dyskusja

Analiza mikroskopowa matrycy Ti/TNT

Na RYS. 1a przedstawiono warstwę nanorurek z ditlenku tytanu otrzymaną metodą anodowania zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Warstwę o grubości $1000 \text{ nm} \pm 100 \text{ nm}$ tworzą jednorodne nanorurki o średnicy $50 \pm 5 \text{ nm}$. Obrazy SEM przedstawiają otwarte od góry, zamknięte od dołu, zorientowane pionowo nanorurki o budowie jednorodnej, pokrywające całą powierzchnię folii tytanu. Nie zaobserwowano uszkodzeń warstwy TNT po procesie wyżarzania (RYS. 1b).

Potencjał stacjonarny Ti/TNT

Krzywe OCP (RYS. 2) obrazują stabilne wartości potencjału zarejestrowane w czasie 1800 sekund. Nie wielkie oscylacje prądowe widoczne na krzywych OCP mogą świadczyć o przebiegających reakcjach utleniania i redukcji warstw ditlenku tytanu w roztworze. Wyżarzanie w atmosferze argonu powoduje podwyższenie wartości E_{cor} w porównaniu z wartościami E_{cor} próbek nie poddanych modyfikacji termicznej. Przesunięcie potencjału korozyjnego w kierunku wartości dodatnich jest korzystne dla immobilizacji substancji biologicznych na powierzchni matrycy biosensora, gdyż większość protein i białek, reszty aminokwasowe (np. w HRP) i ludzkie przeciwciała w roztworze PBS (0.01 M, 50 ml, pH 7.4) wykazują ładunki ujemne.

Microscopy analysis of Ti/TNT platforms

The morphologies of annealed and non-annealed samples were examined with a Field Emission Scanning Electron Microscope JEOL JSM 7600F.

Electrochemical characterization and tests

Cyclic voltammetry tests (CV) for prepared amperometric immunosensor were carried out in PBS (0.01 M, 10 ml, pH 7.4) for potential ranging from -0.8 ± 0.2 V vs. Ag/AgCl with scan rate 0.05 V/s. The response of impedimetric immunosensor was characterized using Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) method. Electrochemical impedance analysis was carried out over a frequency range from 100 kHz to 0.1 Hz (10 points per decade), at zero DC potential, with an AC amplitude of 10 mV and the integration time of 10 s.

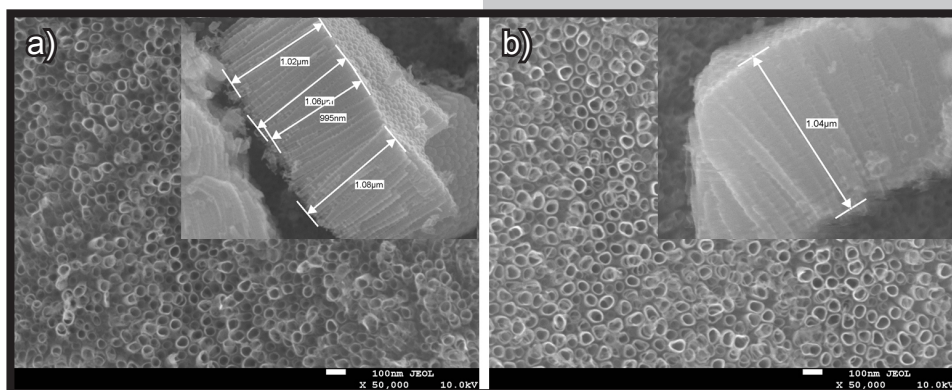
Results and Discussions

Microscopy analysis of Ti/TNT platforms

As it can be seen in FIG. 1 the TNT obtained by anodizing according to the applied parameters (described in “Materials and Methods”) formed an uniform $1000 \pm 100 \text{ nm}$ thick layer of vertically aligned nanotubes (FIG. 1a) with diameter about $50 \pm 5 \text{ nm}$. SEM images show arrays of opened from the top, closed at the bottom and vertically oriented, regular nanotubes covering the titanium foil completely. No damage was observed on TNT layer after annealing (FIG. 1b).

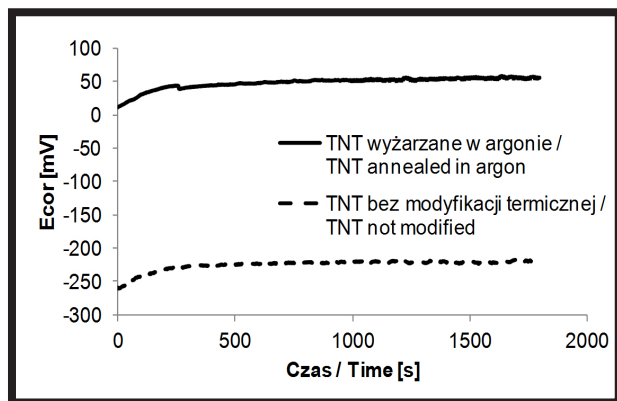
Evaluation of open circuit potential of Ti/TNT

The OCP (Open Circuit Potential) curves (FIG. 2) show stable values of potential recorded during 1800 s. Small current oscillations seen on OPC curves for TNT formed in ethylene glycol electrolyte may suggest ongoing oxidation and metastable nature of nanotubular oxide layers. Annealing in argon causes the increase of the OCP value ($E_{\text{cor}} = 55.1 \text{ mV}$) for Ti/TNT layers comparing to the OCP value for non-annealed samples ($E_{\text{cor}} = -220.1 \text{ mV}$). Shift of the *corrosion potentials* to more *positive values* is *favorable for the* immobilization of biomolecules on the biosensor platform, because the amino acid residues (e.g. HRP) and human antibodies exhibit negative charges in PBS (0.01 M, 50 ml, pH 7.4). The negatively charged protein molecules are easily pulled to the positive matrix of biosensor by direct physical adsorption, which results from weak electrostatic or van der Waals interaction [25].



RYS. 1. Obrazy SEM warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego (a), po modyfikacji termicznej w argonie (b).

FIG. 1. SEM top-view and cross-sectional images of TNT formed in ethylene glycol (a) and thermally modified in argon (b).



RYS. 2. Wykres przebiegu zmian potencjału korozyjnego (E_{cor}) warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego (linia przerywana), wyżarzonych w atmosferze argonu (linia ciągła) rejestrowane w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) w czasie 1800 s.

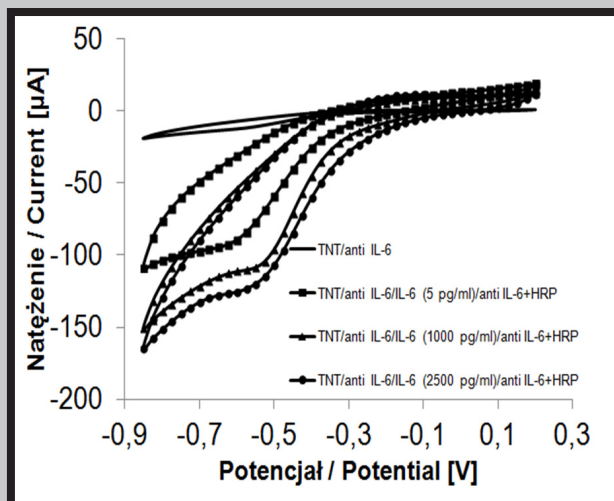
FIG. 2. Corrosion potential values (E_{cor}) of TNT formed in ethylene glycol (dotted line) and annealed in argon (solid line) measured in PBS (0.01 M, 50 ml, pH 7.4) for 1800 s.

Ujemnie naładowane cząsteczki białkowe są z łatwością elektrostatycznie związane przez dodatnio naładowaną matrycę biosensora w procesie adsorpcji fizycznej na skutek słabych oddziaływań elektrostatycznych lub sił van der Waalsa [25].

Elektrochemiczna charakterystyka amperometrycznego biosensora IL-6

Do wykrywania cytokiny IL-6 w roztworze PBS wykorzystano jedno z najsilniejszych i najbardziej specyficznych wiązań biologicznych pomiędzy przeciwciałem i antygenem. W celu detekcji amperometrycznej interleukiny IL-6, modyfikowane termicznie próbki Ti/TNT inkubowano w 10 μ l roztworze przeciwciała anti-IL-6 w czasie 1800 sekund, zanurzono w 10 μ l objętości roztworów zawierających antygeny IL-6 o stężeniach w zakresie od 0 do 2500 pg/ml, a następnie poddawano inkubacji wtórnej w roztworze przeciwciała IL-6 skoniugowanych z peroksydazą chrzanową (HRP). Pomiar metodą woltamperometrii cyklicznej przeprowadzono zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Otrzymane woltamogramy (RYS. 3) ilustrują typowe piki odpowiadające przeniesieniu elektronu w reakcji redoks jonów żelaza peroksydazy chrzanowej HRP.

Przedstawione na RYS. 3 piki katodowe pojawiają się przy potencjalne -0,55 V (vs. Ag/AgCl), charakterystycznym dla redukcji żelaza w grupie hemowej enzymu HRP, w której transport elektronów zachodzi przez redukcję Fe (III) do Fe (II). Często centrum redoks enzymu ukryte jest wewnątrz dużych cząsteczek białka, z dala od powierzchni elektrody. Biorąc pod uwagę niskie wartości współczynnika dyfuzji i prawdopodobieństwo denaturacji kompleksu enzym/białko zaadsorbowanego na powierzchni elektrody, odpowiednie połączenie centrów redoks z powierzchnią elektrody jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za czułość i prawidłowe działanie biosensorów enzymatycznych. Pokrywające tytan nanorurki posiadają szczególną właściwość adsorbowania białek, a przez to zapewniają dobry kontakt elektryczny, co zostało udowodnione w niniejszych badaniach.



RYS. 3. Krzywe woltamperometryczne dla warstw TNT formowanych w roztworze glikolu etylenowego, wyżarzonych w atmosferze argonu, rejestrowane w roztworze 0.01 M PBS (linia ciągła) z dodatkiem ludzkiej IL-6 o różnych stężeniach (5÷2500 pg/ml) w zakresie -0,8÷0,2 V (vs. $E_{Ag/AgCl} = 0,222$ V), z szybkością skanowania 0.05 V/s.

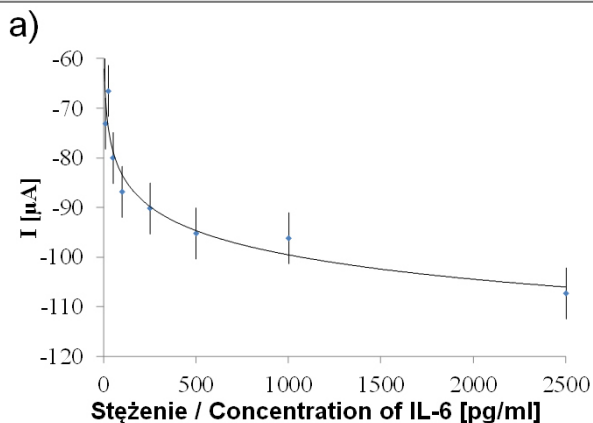
FIG. 3. Cyclic voltammograms of TNT formed in ethylene glycol and annealed in argon recorded in 0.01 M PBS (solid line) containing human IL-6 of various concentration (5÷2500 pg/ml) in potential range -0.8÷0.2 V (vs. $E_{Ag/AgCl} = 0.222$ V), with scan rate 0.05 V/s.

Electrochemical characteristics of the IL-6 amperometric biosensor

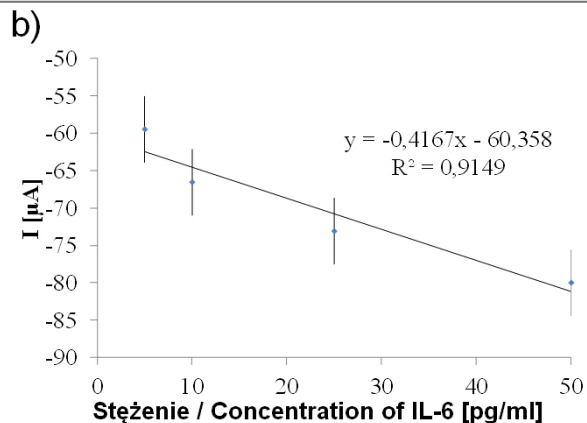
To detect the IL-6 cytokine in PBS solution, the antibody-antigen interaction, one of the strongest and the most specific biological binding was used in the elaboration of the analytical procedures and the preparation of biosensors platforms. For the purpose of amperometric detection of IL-6 thermally modified Ti/TNT samples were incubated with 10 μ l of anti-IL-6 standard solution for 1800 s and then treated with 10 μ l solutions containing IL-6 antigen of various concentration ranging from 0 to 2500 pg/ml, followed by the incubation of secondary IL-6 antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP). Cyclic voltammetry tests (CV) were performed according to the applied parameters (1.5). The obtained peaks (FIG. 3) correspond to the typical electron transfer achieved through the Fe(III) to Fe(II) redox reaction [1].

The reduction peaks appear at -0.55 V (vs. Ag/AgCl). Very often the metal redox center, i.e. the iron heme group in HRP enzyme in which the electron transfer can be achieved through the Fe(III) to Fe(II) redox reaction, are hidden inside large molecules of protein and located far away from the electrode surface. Considering the low values of diffusion coefficient and possible denaturation of enzyme/protein complex adsorbed on the electrode surface, the electrical communication of the metal redox centers with electrode surface is a key factor in the elaboration of enzymatic biosensors. The metal/semiconductor nanotubes systems own this special feature of the effective electrical contact and electron-transfer reaction with electrodes, as has been proved in our investigation.

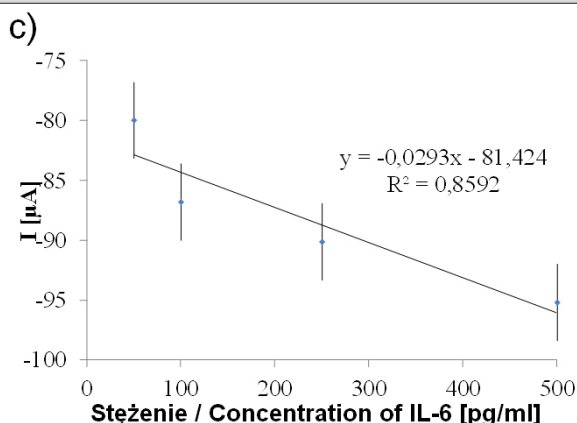
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷2500 pg/ml



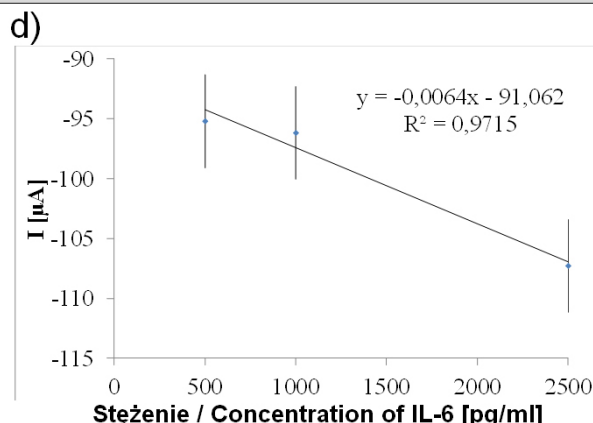
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷50 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 50÷500 pg/ml

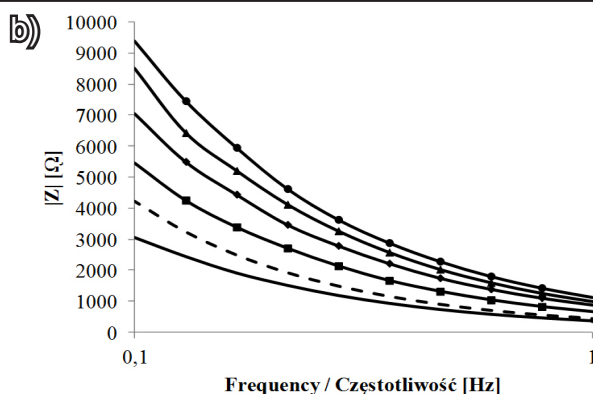
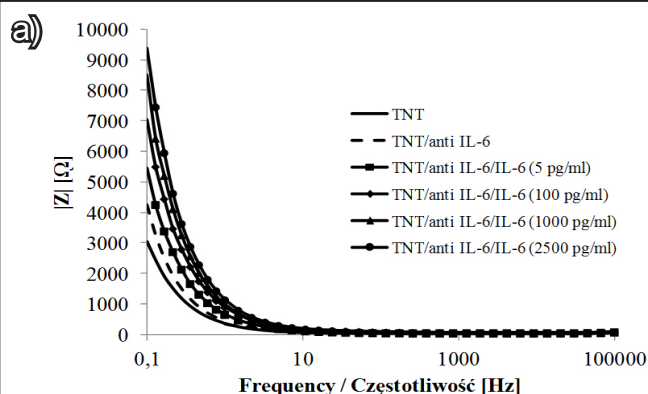


Zakres stężeń / Concentration range: 500÷2500 pg/ml



RYS. 4. Krzywe kalibracyjne biosensora amperometrycznego opartego na sfunkcjonalizowanej przeciwciałami IL-6 warstwie TNT, modyfikowanej termicznie w atmosferze argonu. Wartości prądu katodowego dla wartości potencjału -0,55 V rejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, pH 7,4) względem elektrody chlorosrebrowej ($E_{Ag/AgCl} = 0,222$ V) z szybkością skanowania 0,05 V/s.

FIG. 4. IL-6 calibration curves obtained by the amperometric biosensor-based anti-IL-6 immobilized onto TNT. Cathodic current values were measured at -0.55 V in PBS solution (0.01 M, pH 7.4) vs. $E_{Ag/AgCl} = 0.222$ V with scan rate 0.05 V/s.



RYS. 5. Wykresy Bode rejestrowane dla różnych stężeń IL-6 zarejestrowane przy użyciu biosensora impedancyjnego opartego na matrycy TNT na którą immobilizowano przeciwciała IL-6. Widma zarejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, 50 ml, pH 7,4) w zakresie częstotliwości 0.1 – 10⁵ Hz (a) i 0.1 – 1 Hz (b), z amplitudą 10 mV względem elektrody chlorosrebrowej ($E_{Ag/AgCl} = 0,222$ V).

FIG. 5. Bode plot of various concentration of IL-6 measured using the impedimetric biosensor based on anti-IL-6 immobilized onto TNT. Spectra were recorded in the PBS solution (0.01 M, 10 ml, pH 7.4) over the frequency range 0.1 – 10⁵ Hz (a), and 0.1 – 1 Hz (b) with amplitude 10 mV vs. $E_{Ag/AgCl} = 0.222$ V.

Zależność natężenia prądu od stężenia IL-6 przedstawiono na RYS. 4 w postaci dwóch krzywych kalibracyjnych. Ze względu na szeroki zakres stężeń (5÷2500 pg/ml IL-6) krzywe kalibracyjne na RYS. 4a charakteryzują się nieliniowym przebiegiem. W celu uzyskania krzywych o charakterze liniowym cały zakres został podzielony na mniejsze części na podstawie istotnych klinicznie stężeń IL-6. Krzywe kalibracyjne (RYS. 4b,c,d) wskazują, że przygotowane platformy charakteryzują się wysoką czułością z limitem detekcji IL-6 wynoszącym 5 pg/ml.

Elektrochemiczne charakterystyka biosensora impedancyjnego IL-6

Warstwy TNT sfunkcjonalizowane przeciwciałami IL-6 poddano badaniom metodą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej zgodnie z metodyką opisaną w rozdziale „Materiały i metody”. Odpowiedź impedancyjnego biosensora można przedstawić za pomocą dwóch metod: wykresów Bode lub wykresu Nyquista. Więcej informacji widocznych jest w ujęciu częstotliwościowym, dlatego też autorzy zdecydowali przedstawić wyniki przeprowadzonych pomiarów w reprezentacji Bode. RYS. 5a przedstawia krzywe kalibracyjne dla biosensora impedancyjnego, dla stężenia ludzkiej IL-6 cytokiny w zakresie od 0 do 2500 pg/ml w reprezentacji Bode, ilustrującej zależność modułu impedancji $|Z|$ w funkcji częstotliwości. Najniższą wartość modułu impedancji $|Z|$ ($\sim 3 \times 10^3 \Omega$) odnotowano dla warstwy TNT (średnica 50 nm, grubość 1000 nm) wyrażanej w argonie. Wraz ze wzrostem stężenia IL-6 wzrasta wartość modułu impedancji, co jest wynikiem formowania kompleksów antygen-przeciwciało. Zdolność do wiązania przeciwciał anti-IL-6 na TNT i powstawanie kompleksu antygen-przeciwciało zweryfikowano przez technikę EIS.

Uzyskane krzywe kalibracyjne (RYS. 6) są zależne od oddziaływań zachodzących pomiędzy antygenem IL-6 i ludzkim przeciwciałem monoklonalnym IL-6 z badaną powierzchnią. Limit detekcji uzyskany dzięki pomiarom impedancyjnym wynosi 5 pg/ml. Dla porównania, wyniki testu IL-6 ELISA wykazują limit detekcji na poziomie 25 pg/ml, czyli 5 razy większy, niż uzyskany w niniejszej pracy.

Dotychczas opracowano wiele metod detekcji IL-6, np. za pomocą takich jak: metoda biosensora akustycznego [9], metoda amperometrycznego testu immunologicznego [10], metoda impedancyjnego testu immunologicznego [11], metoda testu immunoenymatycznego (ELISA) [29], technologia powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana [30]. Pomimo licznych zalet powyższych metod, wiele z nich cechuje się skomplikowaną preparatyką i warunkami pomiaru, koniecznością użycia zaawansowanego sprzętu, ograniczoną czułością, czasochłonnością i kszotownością. Do tej pory nie podjęto próby zastosowania nanorurek tlenku tytanu w roli platformy immunosensora służącego detekcji ludzkiej IL-6 opartego na bezpośredniej immobilizacji substancji biologicznych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że matryca Ti/TNT może być platformą biosensora impedancyjnego. Krzywe kalibracyjne dla tego biosensora obejmują stężenia antygenu IL-6 o limicie detekcji wynoszącym 5 pg/ml, co jest odpowiednikiem poziomu fizjologicznego w ludzkiej krwi (poniżej 5 pg/ml) i 2500 pg/ml, co odpowiada stanom patologicznym.

The dependence of current on the concentration of human IL-6 is presented in FIG. 4 by two calibration curves. Due to the wide concentration range (5÷2500 pg/ml of IL-6) the calibration curve in FIG. 4a shows a non-linear character. To obtain a linear calibration curve the whole range was divided into smaller sections based on the clinically important concentrations of IL-6. The calibration curves (FIG. 4b,c,d) presented by a linear regression indicate that the prepared platforms were sensitive to the presence of IL-6 in PBS solution with a detection limit of 5 pg/ml. Good reproducibility was observed during detection of IL-6 with the developed biosensor based on TNT layer as a platform.

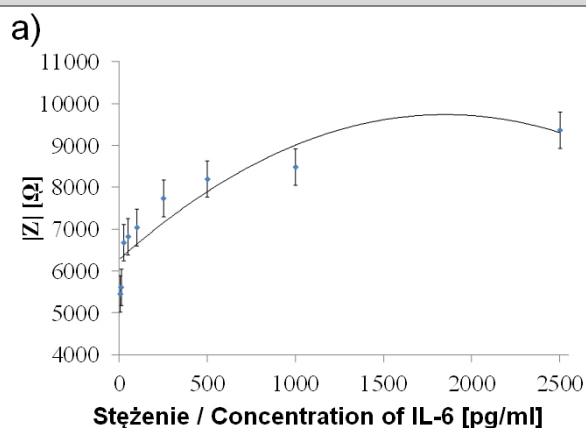
Electrochemical characteristics of the IL-6 impedimetric biosensor

The sequential immobilization of the TNT electrodes with the anti-IL-6 and human-IL-6 antigen was used to detect the IL-6 cytokine with the electrochemical impedance spectroscopy method according to the applied parameters (described in “Materials and Methods”). The response of an impedimetric biosensor can be viewed two different ways: via the Bode plot or via the Nyquist diagram. More information is available on plotting the frequency response, so the authors have decided to present the results of measurement on Bode plots. FIG. 5a shows the impedimetric responses of the biosensor electrode for various concentrations (0÷2500 pg/ml) of human IL-6 cytokine in the Bode representation, where the logarithm of the absolute impedance $|Z|$ is plotted against the logarithm of the excitation frequency. In FIG. 5b the lowest value of the absolute impedance $|Z|$ ($\sim 3 \times 10^3 \Omega$) was recorded for TNT layer (diameter of 50 nm, thickness of 1000 nm) annealed in argon. The absolute impedance $|Z|$ increases gradually with the increase of IL-6 concentration due to the formation of antigen-antibody complexes. Here, the binding ability of anti-IL-6 onto TNT, and formation of antibody-antigen complex were verified through the EIS technique.

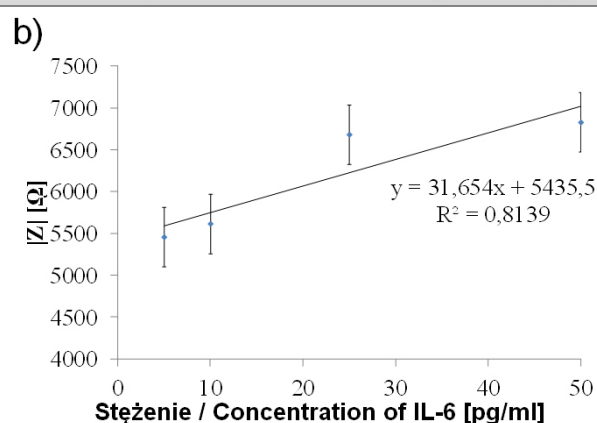
The obtained calibration curves (FIG. 6), prepared similarly as the calibration curves for amperometric detection of IL-6, prove the quantitative interaction between anti-IL-6 and human-IL-6 antigen on the applied sensing surface. The evaluated limit of detection obtained in the impedimetric measurements is 5 pg/ml. For comparison, results from the IL-6 ELISA kit show a detection limit of 25 pg/ml, which is about 5 times higher than the one obtained by our direct detection method.

Several methods have been developed for the detection of IL-6, such as: acoustic wave biosensor [9], amperometric immunoassay [10], impedimetric immunoassay [11], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [29], surface enhanced Raman scattering technology [30]. Despite many advantage of this methods, some of them have drawbacks such as complicated preparing and performing the measurements, complicated equipment, limited sensitivity, impractical time and expense. No attempt, to date, was made to use titania nanotubes as a platform for electrochemical immunosensor to detect the human IL-6 based on direct immobilization of biomolecules. Performed research confirms that Ti/TNT matrix can be used as a platform for impedimetric biosensor. The presented results include the concentrations of IL-6 antigen between the detection limit of 5 pg/ml, which is equivalent to the physiological level in human blood (less than 5 pg/ml) and 2500 pg/ml corresponding to pathological states.

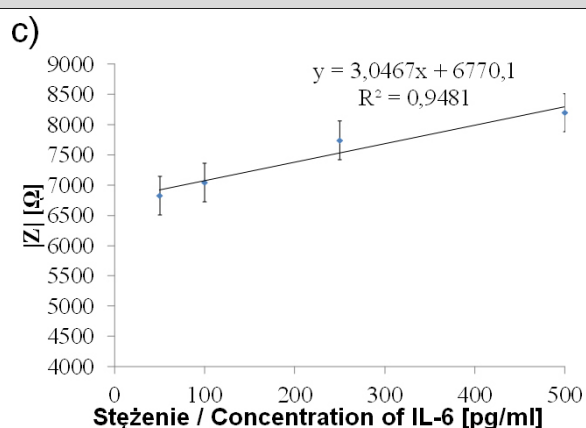
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷2500 pg/ml



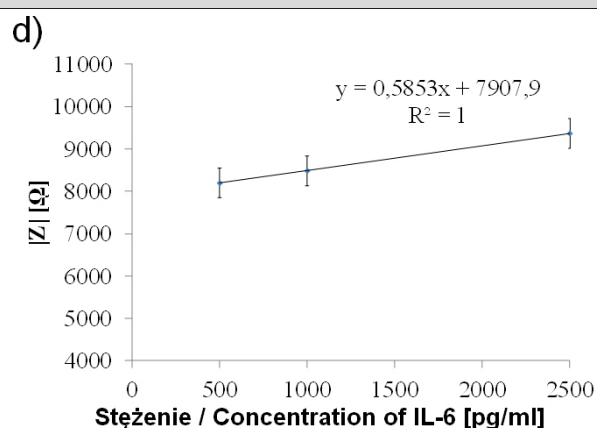
Zakres stężeń / Concentration range: 5÷50 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 50÷500 pg/ml



Zakres stężeń / Concentration range: 500÷2500 pg/ml



RYS. 6. Krzywe kalibracyjne biosensora impedancyjnego opartego na sfunkcjonalizowanej przeciwciałami IL-6 warstwie TNT, modyfikowanej termicznie w atmosferze argonu. Wartości modułu impedancji dla częstotliwości 0,1 Hz rejestrowano w roztworze PBS (0,01 M, pH 7,4) względem elektrody chlorosrebrowej ($E_{Ag/AgCl} = 0,222$ V). **FIG. 6.** IL-6 calibration curves obtained by the impedimetric biosensor-based anti-IL-6 immobilized onto TNT. Impedance modulus were measured at 0.1 Hz in PBS solution (0.01 M, pH 7.4) vs. $E_{Ag/AgCl} = 0.222$ V.

Wnioski

Badania dotyczące warstw nanorurek tytanowych wytworzonych w roztworze glikolu etylenowego (85% glikolu etylenowego + 0,6% wag. NH_4F), wyżarzanych w atmosferze argonu, a następnie wykorzystanych jako platforma biosensorów do oznaczania stężenia cytokiny IL-6 w roztworze PBS, potwierdzają skuteczną immobilizację przeciwciał i antygenów IL-6 w obszarach powierzchniowych. Warstwy te wykorzystano w detekcji IL-6 metodami elektrochemicznymi. Wyniki badań wykazały, że opracowane biosensory: amperometryczny i impedancyjny są czułe na obecność IL-6, a limit detekcji w roztworze PBS wynosi 5 pg/ml.

Podziękowania

Katarzyna Arkusz dziękuje Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wsparcie uzyskane w ramach projektu Diamentowy Grant: „Opracowanie elektrochemicznego biosensora do wykrywania wybranych cytokin na podłożu Ti/TiO_2 ”, 2011-2013.

Conclusions

Studies on titania nanotubes formed in ethylene glycol solution (85% ethylene glycol + 0.6% wt. NH_4F) and annealed in argon and used as biosensor for the IL-6 cytokine confirmed the effective immobilization of anti-IL-6 and human IL-6 antigen on their surface. The results of this study showed that the developed two biosensors: the amperometric and the impedimetric were sensitive to detect the presence of the IL-6 in the PBS solution with the detection limit of 5 pg/ml.

Acknowledgments

Katarzyna Arkusz acknowledges the support by the Ministry of Science and Higher Education in the Diamond Grant project “Electrochemical biosensor based on Ti/TiO_2 platform for detection of selected cytokines”, 2011-2013.

Piśmiennictwo

References

- [1] Sassolas A., Prieto-Simón B., Marty J.L.: Biosensors for Pesticide Detection: New Trends. *American Journal of Analytical Chemistry* 3 (2012) 210-232.
- [2] Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., John Quinn J., Chakraborty T., O'Kennedy R.: Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, Review, *Enzyme and Microbial Techn* 32 (2003) 3-13.
- [3] Brian Bohunicky B., Shaker A Mousa S.: Biosensors: the new wave in cancer diagnosis, Review, *Nanotechnology, Science and Applications* 4 (2011) 1-10.
- [4] Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I.: Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Analytica Chimica Acta* 400, 1-3 (1999) 91-108.
- [5] Freire R.S., Pessoa C.A., Mello L.D., Kubota L.T.: Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. *J. Braz. Chem. Soc* 14 (2003) 230-43.
- [6] Scheller J., Chalaris A., Schmidt-Arras D., Rose-John S.: The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813 (2011) 878-888.
- [7] Heikkilä K., Ebrahimb S., Lawlor D.A.: Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *European Journal of Cancer* 44 (2008) 937-945.
- [8] Guo Y., Xu F., Lu T.J., Duan Z., Zhang Z.: Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews* 38 (2012) 904-910.
- [9] Krishnamoorthy S., Iliadis A.A., Beic T., Chrousos G.P.: An interleukin-6 ZnO/SiO₂/Si surface acoustic wave biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 313-318.
- [10] Kapoor R., Wang C.W.: Highly specific detection of interleukin-6 (IL-6) protein using combination tapered fiber-optic biosensor dip-probe. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 2696-2701.
- [11] Wang G., Huang H., Zhang G., Zhang X., Fang B., Wang L.: Dual Amplification Strategy for the Fabrication of Highly Sensitive Interleukin-6 Amperometric Immunosensor Based on Poly-Dopamine. *Langmuir* 27, 3 (2011) 1224-1231.
- [12] Joo J., Kwon D., Yim C., Jeon S.: Highly Sensitive Diagnostic Assay for the Detection of Protein Biomarkers Using Microresonators and Multifunctional Nanoparticles. *Acsnano* 6, 5 (2012) 4375-4381.
- [13] Yanga T., Wang S., Jin H., Baoa W., Huang S., Wang J.: An electrochemical impedance sensor for the label-free ultrasensitive detection of interleukin-6 antigen. *Sensors and Actuators B* 178 (2013) 310-315.
- [14] Xiao P., Zhang Y., Garcia B.B., Sepehri S., Liu D., Cao G.: Nanostructured Electrode with Titania Nanotube Arrays: Fabrication, Electrochemical Properties, and Applications for Biosensing. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8 (2008) 1-11.
- [15] Wang Y., Xu H., Zhang J., Li G.: Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. *Sensors* 8 (2008) 2043-2081.
- [16] Guo C.X., Hu F.P., Li C.M., Shen P.K.: Direct electrochemistry of hemoglobin on carbonized titania nanotubes and its application in a sensitive reagentless hydrogen peroxide biosensor. *Biosens Bioelectron* 24 (2008) 819.
- [17] Mubarak A., Muhammad N.T., Zuzanna S., Reinhard N., Wolfgang T., Ensinger W.: Hydrogen peroxide sensing with horseradish peroxidase-modified polymer single conical nanochannels. *Anal Chem* 83 (2011) 1673.
- [18] Zhang J.D., Oyama M.: A hydrogen peroxide sensor based on the peroxidase activity of hemoglobin immobilized on gold nanoparticles-modified ITO electrode. *Electrochim Acta* 50 (2004) 85.
- [19] Degani R., Heller A.: Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase. *J Am Chem Soc* 110 (1998) 2615.
- [20] Yang B., Ng C.K., Fung M.K., Ling C.C., Djuricic A.B., Fung S.: Annealing study of titanium oxide nanotube arrays. *Materials Chemistry and Physics* 130 (2011) 1227-1231.
- [21] Xiao P., Liu D., Garcia B.B., Sepehri S., Zhang Y., Cao G.: Electrochemical and photoelectrical properties of titania nanotube arrays annealed in different gases. *Sensors and Actuators B* 134 (2008) 367-372.
- [22] Wang J.: Nanomaterial-based electrochemical biosensors. *Analyst*, 130 (2005) 421-426.
- [23] Valentini F., Palleschi G.: Nanomaterials and analytical chemistry. *Analytical Letters* 41 (2008) 479-520.
- [24] Viticoli M., Curulli A., Cusma A., Kaciulis S., Nunziante S., Pandolfi L., Valentini F., G. Padeletti G.: Third-generation biosensors based on TiO₂ nanostructured films. *Materials Science and Engineering C* 5-7 (2006) 947-951.
- [25] Ruzgasa T., Csöregib E., Emnéusb J., Gorton L.: Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta* 330, 2-3 (1996) 123-138.
- [26] Ferapontova E., Dominguez E.: Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: effect of surface charges. *Bioelectrochemistry* 55 (2002) 127-130.
- [27] Wang L., Wang E.K.: A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode. *Electrochem Commun* 6 (2004) 225.
- [28] Krasicka-Cydzik E., Arkusz K., Kaczmarek A.: A mathematical model for selection of formation parameters of TiO₂ nanotube by anodizing. *Engineering of Biomaterials* 15, 114 (2012) 34-40.
- [29] Turner C.K., Blieden T.M., Smith T.J., Feldon S.E., Foster D.C., Sime P.J., Phipps R.P.: A novel ELISpot method for adherent cells. *J. Immunol. Methods* 291 (2004) 63-70.
- [30] Wang Y.L., Salehi M., Schutz M., Rudi K., Schlucker S.: Determination of Multiresidual Fungicides in Environmental Water Samples by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analyst*, 138 (2013) 1764-1771.

BIOWCHŁANIALNE PŁYTKI ZESPALAJĄCE DLA WETERYNARII

BARBARA SZARANIEC^{1*}, KAROL GRYŃ¹, TOMASZ SZPONDER²,
BEATA ŻYLIŃSKA²

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

² UNIwersYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE,
WYDZIAŁ MEDYCYN WETERYNARYJNEJ,
KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII ZWIERZĄT,
UL. GŁĘBOKA 30, 20-612 LUBLIN

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

Streszczenie

Niniejsza praca stanowi próbę opracowania nowych biowchłanialnych płytek zespalających dla potrzeb weterynarii dedykowanych szczególnie psom ras miniaturowych. Tego typu płytki mogą stanowić alternatywę dla implantów metalicznych. Do największych zalet proponowanych konstrukcji można zaliczyć brak konieczności usuwania ich z organizmu po wyleczeniu złamanej kości oraz ułatwioną, w porównaniu do implantów metalicznych, ocenę radiologiczną procesu gojenia ze względu na przepuszczalność zastosowanego materiału dla promieni X. Ograniczeniem stosowania płytek wykonanych z czystych polimerów resorbowlanych np. polilaktydu (PLA) są stosunkowo słabe właściwości mechaniczne. W związku z tym, w ramach poniższej pracy, zaproponowano cztery sposoby modyfikacji parametrów wytrzymałościowych i użytkowych czystego polimeru resorbowlanego.

Do matrycy polimerowej z czystego PLA wprowadzono cztery rodzaje wzmocnienia: włókna węglowe, włókna poliakrylonitrylowe, drut ze stali chirurgicznej i drut magnezowy. Płytki proste sześciokątne wykonano metodą wtrysku. Fazę wzmacniającą w postaci włókien lub drutu formowano w kształt odpowiadający obrysowi zewnętrznemu płytki. Tak przygotowane pętle umieszczano w formie wtryskowej, a następnie obtryskiwano ciśnieniowo polimerem w temp. 165-170°C. Gotowe płytki zespalające poddano badaniom wytrzymałościowym. W tym celu przygotowano krótkie drewniane wałki, do których metalowymi wkrętami przykręcano płytki (dwa wałki imitujące złamaną kość łączono jedną płytką). Następnie taki układ symulujący zespolenie kostne poddawano testom jednoosiowego rozciągania na maszynie wytrzymałościowej. Równocześnie przeprowadzono badania *in vitro* w środowisku wodnym. Określono zmiany pH, przewodności elektrycznej oraz zmiany masy i wytrzymałości po 6 tygodniowej inkubacji.

Spośród badanych materiałów najlepsze właściwości mechaniczne uzyskano w przypadku modyfikacji polimeru fazą włóknistą. Dodatkowo wprowadzenie włókien pozwoliło uzyskać korzystniejszy rozkład naprężeń i odkształceń w obrębie otworów mocujących oraz wynikający z tego efektywniejszy sposób przeniesienia obciążenia podczas jednoosiowego rozciągania.

Słowa kluczowe: płytki zespalające, osteosynteza, polimery resorbowlane, włókna wzmacniające, druty, polilaktyd

[Inżynieria Biomateriałów 125 (2014) 30-36]

BIODEGRADABLE FIXATION PLATES FOR VETERINARY MEDICINE

BARBARA SZARANIEC^{1*}, KAROL GRYŃ¹, TOMASZ SZPONDER²,
BEATA ŻYLIŃSKA²

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

² UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IN LUBLIN,
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
DEPARTMENT AND CLINIC OF VETERINARY SURGERY
UL. GŁĘBOKA 30, 20-612 LUBLIN, POLAND

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

Abstract

This article is an attempt to develop a new concept of biodegradable fixating miniplates for veterinary medicine, specially for toy breed dogs. Polymer-based composite fixation system can be a good alternative for widely used metallic implants because there is no removal operation needed after the bone is recovered. Moreover, the radiological evaluation of a fracture healing process is much easier and more precise due to the fact that polymers are transparent for X-rays. Low mechanical properties of pure biodegradable polymers e.g.: polylactide (PLA) is one of the biggest drawbacks. For the development of implants with better mechanical and practical properties (compared to pure polymer PLA) four types of composite materials were proposed.

Poly lactide matrix was reinforced with: carbon fibres, polyacrylonitrile fibres, surgical steel wire and magnesium wire. Injection moulding process was applied to fabricate a six-hole I-shaped miniplates. Firstly, reinforcing phases (fibres or wires) were shaped to copy a contour of a miniplate. Then a "loop" of a fibre bundle or a wire was placed in the mould. Plastified PLA ($T = 165-170^{\circ}\text{C}$) was injected into the mould under a high pressure filling it and covering reinforcing phase. For mechanical testing of fabricated implants a special system was prepared to simulate "real work conditions". Short wooden rods were used to imitate the broken bone. Two rods were linked together with a composite miniplate fixed with metallic screws and tested in uniaxial tensile strength machine. Simultaneously *in vitro* tests were carried out. Degradation in water environment was verified. During six-weeks incubation process changes in pH values, electrical conductivity, mass loss and mechanical properties were monitored.

The performed research demonstrated that the most desirable results were recorded for the polymer modified with the fibrous phase.

Keywords: fixation plates, osteosynthesis, resorbable polymers, reinforcing fibres, wires, polylactide

[Engineering of Biomaterials 125 (2014) 30-36]

Wprowadzenie

Leczenie złamań kości przedramienia psów ras miniaturowych od lat stanowi wyzwanie dla lekarzy weterynarii. Spowodowane jest to zarówno specyficznymi uwarunkowaniami anatomicznymi (rozmiar kości, niedostateczne unaczynienie nasady dalszej kości promieniowej) jak i wynikającymi z nich ograniczeniami dotyczącymi wyboru implantów kostnych [1]. Alternatywą mogą być stabilizujące, biochłaniające płytki do zespołów kostnych, stosowane z powodzeniem w chirurgii szczękowej i w ortopedii [2,3]. Ich najważniejsze zalety, w odniesieniu do małych zwierząt, to: dobra biotolerancja, brak objawów osteopenii w trakcie procesu gojenia kości i konieczności usuwania implantów oraz ułatwiona, w porównaniu do implantów metalicznych, ocena radiologiczna procesu gojenia [4,5]. Przy stosowaniu biochłaniających płytek, z uwagi na obciążenia kończyny piersiowej, która u większości zwierząt jest poddawana większym obciążeniom niż miedniczna, konieczne było stosowanie dodatkowych opatrunków unieruchamiających [6,7]. Zastosowanie czystego polimeru resorbowalnego, ze względu na stosunkowo niskie własności wytrzymałościowe, może być zasadne tylko w przypadkach pozycjonowania odcinków kostnych. Płytkę polimerową nie przenosi wtedy naprężeń związanych z naturalnym obciążeniem złamanej kości. Z tego powodu konieczne jest wspomaganie zespolenia poprzez zastosowanie unieruchomienia zewnętrznego w postaci stabilizatora lub opatrunku usztywniającego. W przypadku psów ras miniaturowych wymiary kości utrudniają, a czasem wręcz uniemożliwiają stosowanie omówionych wyżej technik hybrydowych, dlatego też rozpoczęto badania nad opracowaniem płytek zespalających zdolnych do przenoszenia obciążeń bez zewnętrznego wspomagania.

W celu poprawy parametrów wytrzymałościowych płytek biochłaniających autorzy zaproponowali wzmocnienie ich konstrukcji za pomocą umieszczonych „obwodowo” różnych typów włóknistej fazy wzmacniającej. Ze względu na dopuszczenie medyczne oraz łatwość formowania, a także możliwość wykorzystania w technologii przetwórstwa polimerów metodą wtrysku, zastosowano materiały biochłaniające w postaci włókien węglowych, włókien poliakrylonitrylowych oraz drutu magnezowego. Dodatkowym atutem wybranych do badań materiałów jest dobre związanie ich powierzchni z osnową, którą stanowił biochłaniający PLA. W celu porównania uzyskanych parametrów przygotowano także próbki o takiej samej geometrii z czystego, niewzmocnianego polimeru oraz płytki wzmacniane drutem ze stali chirurgicznej.

Materiały i metody

Otrzymywanie

Sześcioletowe płytki zespalające o wymiarach: 70 mm x 7 mm x 2 mm otrzymywano metodą wtrysku ($T = 165\text{--}170^\circ\text{C}$, ciśnienie w układzie 80 kg/cm^3) (RYS. 1 i 2). Jako osnowę użyto polimer resorbowalny polilaktyd Ingeo 3251D firmy Nature Works. Płytki wzmacniano „na obwodzie” włóknami ciągłymi lub pętlami z drutu. Zastosowano odpowiednio: włókna węglowe T300, ($\sigma = 3,2\text{ GPa}$, $E = 235\text{ GPa}$, Toray Carbon Fibers America), włókna poliakrylonitrylowe ($\sigma = 330\text{ MPa}$, $E = 5,7\text{ GPa}$, Katedra Włókien Sztucznych, Wydział Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej), drut stalowy do wiązania odcinków kostnych ($\varphi = 0,9\text{ mm}$, Mikromed Dąbrowa Górnicza) oraz drut ze stopu magnezu ($\varphi = 1,23\text{ mm}$, skład: glin 2,5-3,5%, cynk 0,8-1,5%, lit, metale ziem rzadkich, wapń $< 1\%$, Leibniz Universität Hannover, Niemcy). Udział masowy wprowadzonych włókien, zarówno węglowych jak i poliakrylonitrylowych, wynosił $10\pm 0,3\%$. W przypadku drutu magnezowego stanowił on ok. 25%mas., a drutu stalowego ok. 46%mas.

Introduction

Treatment of forearm bone fractures in toy breed dogs has been a persistently difficult challenge for veterinary practitioners. The same stems both from the specificity of anatomic conditions (bone size, insufficient vascularisation of radial bone distal epiphysis) as well as the related limitations in terms of the available bone implant variants [1]. In this respect, an alternative could be provided by using bioabsorbable bone stabilization plates of the type already successfully employed in maxillofacial surgery and orthopaedics [2,3]. Their most important advantages in the context of small animals include: good biotolerance, lack of symptoms of osteopenia during the bone healing process, no necessity of implant removal, as well as a better, when compared to metallic implants, ability to evaluate the healing process radiologically [4,5]. Due to the increased load on the forelimb, which in most animals is normally subjected to higher loads than the hind-limb, it was necessary to apply additional immobilising dressing [6,7]. An implant made of pure biodegradable, because of its rather low mechanical properties, can be applied only under certain conditions. Such implant keeps pieces of broken bone in position only, but it does not bear the load. For this purpose an external stabilization is needed. When toy breed dogs are taken under consideration, particularly their bones diameters, application of hybrid fixation system is difficult and sometimes can not be done at all. What can be done to solve this problem? One of the possible ways is making an implant more durable, so it can bear higher loads and can be applied without an external stabilizer. In this research the authors proposed strengthening of biodegradable polymer matrix (PLA) with introduction of fibre reinforcing phase shaped in “a loop” matching the geometry of the fixation plate. Due to easy shaping and application for injection moulding technology, four distinct bioresorbable materials with medical application approval were chosen as a reinforcement: carbon fibres, polyacrylonitrile fibres and magnesium wire. For comparative purposes samples with the same geometry made of pure polymer (PLA) and samples reinforced with surgical steel wire were prepared and tested.

Materials and Methods

Samples preparation

Six-hole, 70 mm x 7 mm x 2 mm fixation plates were produced by means of injection moulding ($T = 165\text{--}170^\circ\text{C}$, system pressure 80 kg/cm^3) (FIGs. 1 and 2). The groundmass of resorbable polylactide Ingeo 3251D produced by Nature Works was used. The plates were reinforced “peripherally” with continuous fibres or looped wire. We used, respectively: carbon fibres T300, ($\sigma = 3.2\text{ GPa}$, $E = 235\text{ GPa}$, Toray Carbon Fibers America), polyacrylonitrile fibers ($\sigma = 330\text{ MPa}$, $E = 5.7\text{ GPa}$, Department of Man-made Fibres, Faculty of Material Technology and Textile Design at Łódź University of Technology), steel wire used in bone surgery ($\varphi = 0.9\text{ mm}$, Mikromed Dąbrowa Górnicza), and magnesium alloy wire ($\varphi = 1.23\text{ mm}$, ingredients: aluminium 2.5-3.5%, zinc 0.8-1.5%, lithium, rare earth metals, calcium $< 1\%$, Leibniz Universität Hannover, Germany).

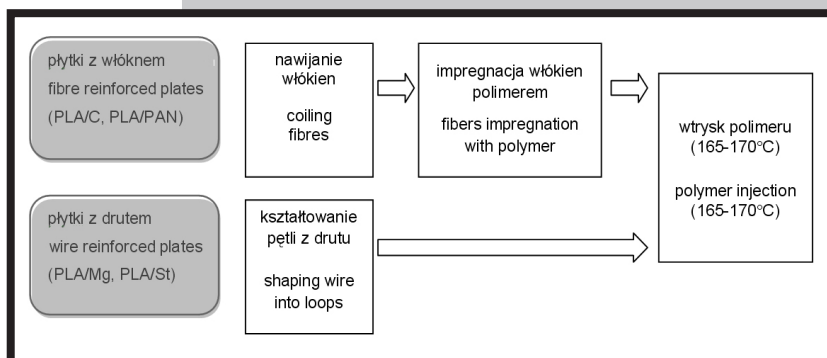
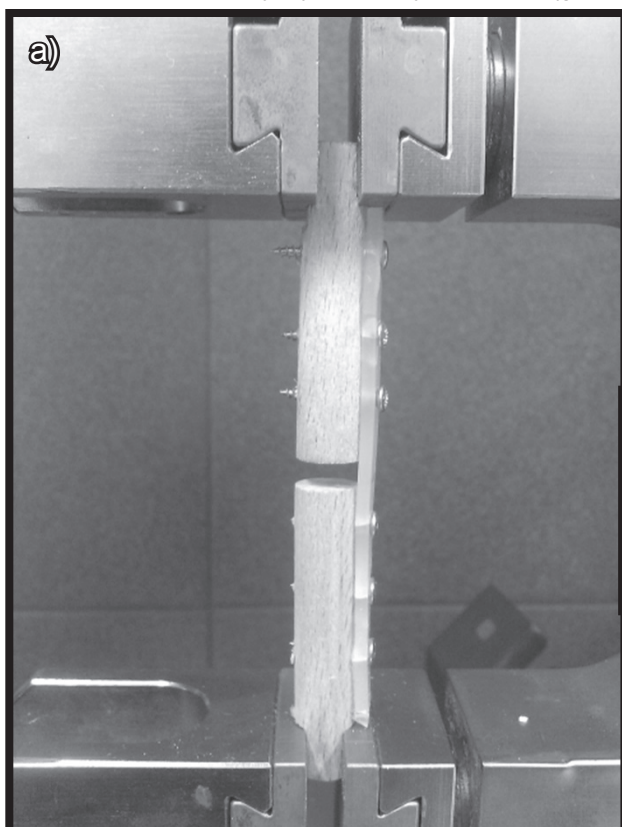
Before injection, wires were bent to fit the plate mould (FIG. 2a). Fibre bundles were shaped analogically, after impregnation in 10% solution of polylactide in dichloromethane, the bundles were shaped while “wet”. The fibre or wire was placed inside the injection mould, which was then locked and filled with plasticised polymer (injection). The following types of plates were obtained: PLA/C - polylactide/carbon fibres, PLA/PAN - polylactide/polyacrylonitrile fibres, PLA/Mg - polylactide/magnesium wire and PLA/St - polylactide/steel wire and PLA as a reference.

Przed wtryskiem druty doginano do konturu płytki (RYS. 2a). Analogiczny kształt nadawano wiązkom włókien, które po zaimpregnowaniu w 10% roztworze polilaktydu w dichlorometanie kształtowano „na mokro”. Włókna lub drut umieszczano w formie wtryskowej, którą po zamknięciu wypełniano uplastycznionym polimerem (wtrysk). Otrzymano następujące rodzaje płytek: PLA/C - polilaktyd/włókna węglowe, PLA/PAN - polilaktyd/włókna poliakrylonitrylowe, PLA/Mg - polilaktyd/drut magnezowy oraz dla porównania PLA/St - polilaktyd/drut stalowy oraz z czystego PLA.

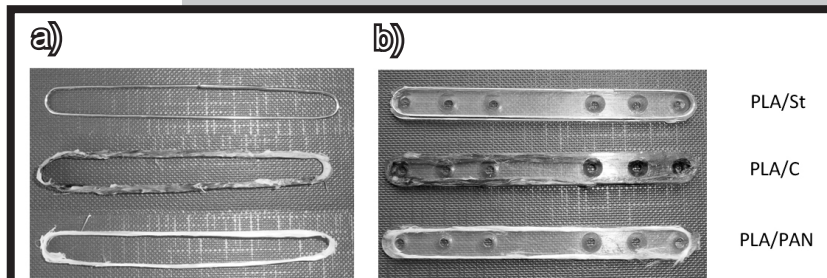
Badania mechaniczne

Ze względu na wstępny charakter badań testy przeprowadzono na ograniczonej liczbie próbek. Ponieważ faza modyfikująca w postaci jednoosiowo zorientowanych włókien daje najlepsze efekty wzmocnienia kompozytu podczas rozciągania jednoosiowego wzdłuż włókien, zdecydowano o przeprowadzeniu testów w takim schemacie naprężeniowo-odkształceniowym.

W celu oceny właściwości użytkowych otrzymanych płytek zmontowano układy imitujące zespolenie kostne (RYS. 3), po 5 układów dla każdego rodzaju płytek. Do drewnianych wałków o średnicy 10 mm przykręcono płytki za pomocą 6 wkrętów stalowych o średnicy 2 mm. Tak przygotowane układy podzielono na dwie grupy: 1) do określenia parametrów wytrzymałościowych próbek wyjściowych, 2) do określenia parametrów wytrzymałościowych próbek poddanych sześciotygodniowej inkubacji (po tym czasie przeprowadzono testy mechaniczne). Płytki rozciągano na maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 z prędkością 20 mm/min. Mierzono wytrzymałość płytek na rozciąganie.



RYS. 1. Schemat otrzymywania płytek zespalających.
FIG. 1. Diagram of fixation plates production.



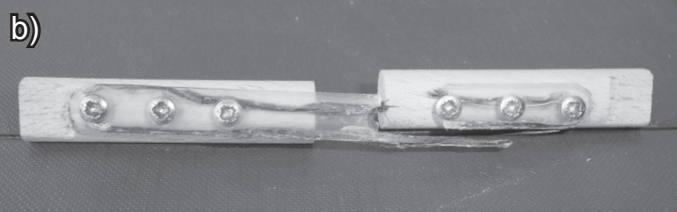
RYS. 2. a) Elementy wzmacniające po ukształtowaniu do formy wtryskowej (od góry: drut stalowy, włókna węglowe i włókna PAN po impregnacji), b) wytworzone płytki zespalające.

FIG. 2. a) Reinforcing elements shaped to fit the injection mould (from the top: steel wire, PAN wires and carbon wires after impregnation), b) finished fixation plates.

Mechanical testing

Conducted research is preliminary, that is why small number of samples was used. Fibre reinforcing phase gives the best strengthening effect when tensile stress is parallel to the fibres. That is why the authors decided to test the samples in uniaxial tensile conditions.

Special setups imitating the conditions of osteosynthesis were prepared to assess practical applicability of the obtained plates (FIG. 3). The plates were attached to wooden rods of 10 mm in diameter with the use of six 2 mm steel screws. Attached plates were divided in two groups: 1) for “green samples” mechanical characterization 2) for incubated samples mechanical characterization (firstly the samples were incubated for six weeks in distilled water 37°C, and after this period of time they were mechanically tested). Samples were tested under uniaxial tensile stress at the speed of 20 mm/min (Zwick 1435). The tensile strength of the plates was measured.



RYS. 3. Układ do badań mechanicznych z przykręconą płytką zespalającą: a) w trakcie rozciągania, b) po zniszczeniu (PLA/C).

FIG. 3. The mechanical test setup with a fixation plate attached: a) during the tensile strength test, b) ruptured (PLA/C).

Inkubacja

W celu sprawdzenia mechanizmu degradacji materiału płytki inkubowano w wodzie destylowanej w temperaturze $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ przez okres 6 tygodni przyjmując, że jest to minimalny okres dla uzyskania pierwotnego wzrostu kostnego [8]. W trakcie inkubacji dokonywano pomiarów pH z dokładnością $\pm 0,01$ (pH-metr Elmetron CP-315M), przewodności płynów z dokładnością $\pm 0,01$ $\mu\text{S/cm}$ (konduktometr Elmetron CC-315) oraz masy płytek „na sucho” z dokładnością $\pm 0,001$ g (waga laboratoryjna RADWAG PS360/C/2). Medium wymieniano w następujących interwałach czasowych: 24 h, 3 tyg., 6 tyg. Po 6 tygodniach inkubacji wyznaczono powtórnie właściwości mechaniczne badanych płytek zespalających. Pomiary prowadzono dla 5 próbek z każdego rodzaju materiału. Obliczono wartość średnią wraz z odchyleniem standardowym.

Wyniki i dyskusja

Analizując właściwości mechaniczne otrzymanych płytek (TABELA 1) widoczne jest, że wszystkie wprowadzane fazy modyfikujące poprawiają wytrzymałość polimeru. Największy wzrost wytrzymałości, w stosunku do niemodyfikowanego PLA, odnotowuje się przy zastosowaniu włókien węglowych (ponad 80%) i PAN (ponad 60%), najmniejszy dla drutów magnezowych (ok. 20%) i stalowych (ok. 30%). Uzyskano tym samym wartości mieszczące się w zakresie wytrzymałości na rozciąganie kości zbitej.

W przypadku zbrojenia płytek drutami kluczowe znaczenie ma granica rozdziału faz drut-polimer. Zauważono słabą adhezję (nie stwierdzono trwałego związania powierzchni) drutu stalowego z osnową polimerową. W przypadku drutu magnezowego stopień adhezji był zadowalający, podczas gdy próbki wzmacniane włóknem poliakrylonitrylowym i węglowym cechowały się bardzo dobrym związaniem z osnową.

Analizując wygląd próbek po testach mechanicznych stwierdzono, że dla płytek PLA/St oraz PLA/Mg sposób niszczenia podczas rozciągania był podobny jak w przypadku czystego PLA. Linia kruchego pęknięcia przebiegała zawsze prostopadle do osi działania siły rozciągającej, z obu stron pierwszego od środka otworu mocującego (najbliższego miejscu złamania kości). W przypadku rozciągania próbek wzmacnianych włóknami widoczne jest występowanie mechanizmów ograniczających kruche pęknięcie m.in.: mostkowanie pęknięć i wyciąganie włókien. Można też stwierdzić, że w obu przypadkach (PLA/C i PLA/PAN) udało się dobrze przesądzić włókna oraz trwale je związać z osnową polimerową. Schemat pęknięcia kompozytów włóknistych można przeanalizować na podstawie RYS. 3b i 4. Wyraźna linia rozdziału, przypominająca wydłużoną literę Z składa się z trzech odcinków. Zaczyna się jednostronnym poprzecznym pęknięciem przy pierwszym (od środka) otworze mocującym, następnie propaguje wzdłuż osi długiej próbki do sąsiedniego, drugiego otworu by ponownie zmienić kierunek na poprzeczny i zakończyć jednostronnym pęknięciem po przeciwnej do pierwszego odcinka stronie. Taki schemat pęknięcia sugeruje sprężyste odkształcenie włókien oraz niewielkie skręcenie płytki w stosunku do działającej siły. Wynikiem tego może być bardziej korzystny rozkład naprężeń i odkształceń, gdyż obciążenie jest przenoszone przez wszystkie wkręty mocujące płytkę.

Incubation

The plates were incubated in distilled water at 37°C over a period of 6 weeks. During incubation, measurements of pH ± 0.01 (pH-metr Elmetron CP-315M), fluid conductivity ± 0.01 $\mu\text{S/cm}$ (conductometer Elmetron CC-315) and “dry” plate mass ± 0.001 g were performed (RADWAG PS360/C/2). The medium was renewed after the following time intervals: 24 h, 3 weeks, 6 weeks. After 6 weeks of incubation, the mechanical characteristics of the analysed fixation plates were once again tested.

Results

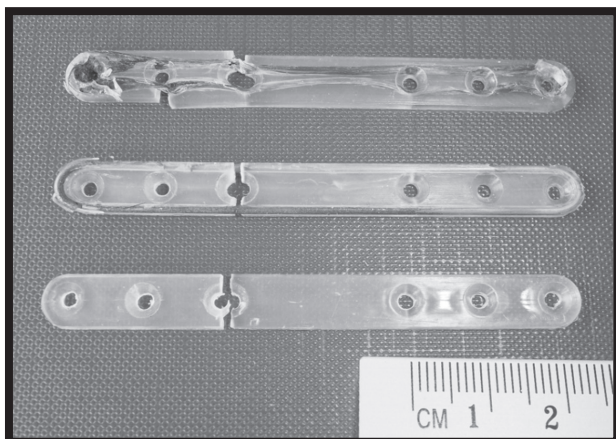
TABELA 1. Wytrzymałość na rozciąganie płytek zespalających.
TABLE 1. Tensile strength of particular fixation plates.

Material Material	Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [MPa]
PLA/C	80 ± 6
PLA/PAN	70 ± 9
PLA/St	58 ± 8
PLA/Mg	53 ± 8
PLA	44 ± 14
Kość zbita Cortical bone [9]	50-180

Analysing the mechanical characteristics of the obtained plates (TABLE 1), it was demonstrated that each of the introduced modifying phases improved the strength of the polymer. The highest increase in terms of strength, when compared with pure PLA, was observed for carbon fibres (over 80%) and PAN fibres (over 60%), followed by steel wire (approx. 30%) and magnesium wire (approx. 20%). Results obtained are congruent with a cortical bone tensile strength.

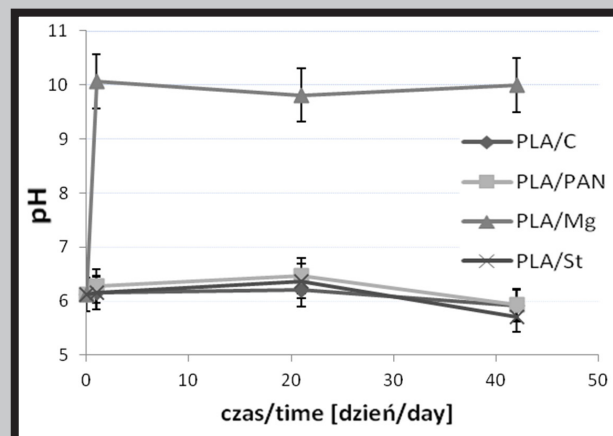
When plates are reinforced with metallic wire, the key issue is the border between the phases wire-polymer. There was very low adhesion (no firm bonding) between steel wire and PLA matrix whereas good adhesion between magnesium wire and PLA matrix was observed. Very good adhesion was revealed for carbon and polyacrylonitrile fibres.

In the case of PLA/St and PLA/Mg plates, the pattern of eventual rupture was the same as in the case of pure PLA. The line of brittle rupture was always perpendicular to the axis of the tensile force and located on both sides of the centre-most (nearest to the bone fracture) screw-hole. When the tested plate was reinforced with fibres, mechanisms limiting the occurrence of brittle fractures were present, including bridging of ruptures and stretching fibres. The model of the rupturing of fibre composites can be analysed in FIGs 3b and 4. A clear line of division, similar to a somewhat elongated letter Z, comprised three sections. It started with a unilateral, transverse fracture at the centre-most screw-hole, then it propagated along the long axis of the sample towards the next hole, where it changed direction once again to become transverse and ended with a unilateral fracture on the opposite side to the first section. This model of the rupturing process may suggest elastic strain of the fibres and a slight twist of the plate in reference to the applied force. As a result more favourable distribution of stress and strain can be obtained due to the fact that the load is conveyed to all six screws.



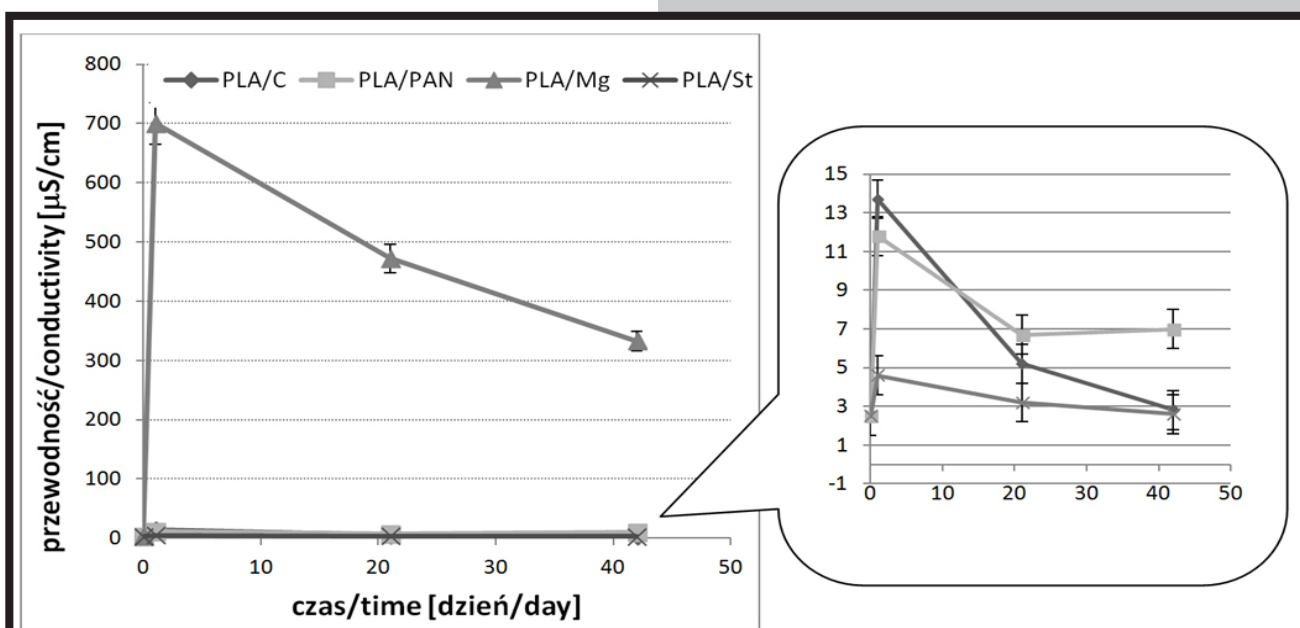
RYS. 4. Płytki zespalające po zniszczeniu, od góry: PLA/C, PLA/Mg oraz PLA.

FIG. 4. Ruptured fixation plates, from the top respectively: PLA/C, PLA/Mg and PLA.



RYS. 5. Zmiany pH wody destylowanej w trakcie inkubacji płytek zespalających.

FIG. 5. Changes in the distilled water pH during the incubation of fixation plates.

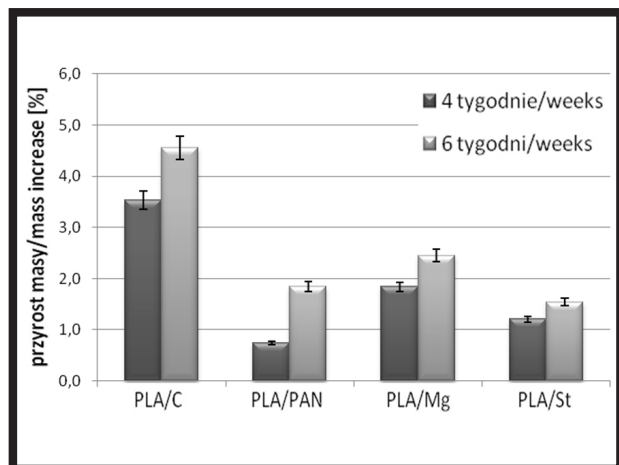


RYS. 6. Zmiany przewodności wody destylowanej w trakcie inkubacji płytek zespalających.

FIG. 6. Changes in distilled water conductivity during the incubation of fixation plates.

Sześciotygodniowa inkubacja w środowisku wodnym płytek polimerowych wzmocnionych włóknem węglowym, włóknem PAN lub drutem stalowym wykazała brak istotnego wpływu tych materiałów na pH i przewodność medium inkubacyjnego (RYS. 5 i 6). Początkowo dla materiałów modyfikowanych włóknami widoczny jest niewielki wzrost przewodności lecz po kolejnych wymianach płynu wartości pozostają na poziomie odpowiadającym czystej wodzie. W przypadku modyfikacji drutem magnezowym już w pierwszej dobie odczyn medium ulega zmianie na zasadowy i mimo wymiany płynu utrzymuje się w granicach pH ~10 przez cały okres trwania eksperymentu. W przypadku przewodności wraz z czasem trwania inkubacji zmiany stają się coraz mniejsze (RYS. 6). Mimo dobrej adhezji na granicy drut magnezowy-polimer faza wzmocniająca nie jest dobrze zabezpieczona przed wpływem środowiska wodnego i zbyt szybko ulega degradacji. Zapoczątkowana resorpcja drutów magnezowych może w konsekwencji stwarzać potencjalne zagrożenie dla otaczających tkanek.

The six week water incubation of polymer plates reinforced with carbon fibre, PAN fibre or steel fibre revealed no significant influence of the materials on the pH and conductivity of the medium (FIGs. 5 and 6). Initially, for materials modified with fibres, a slight increase in conductivity was observed, but after the subsequent liquid replacements its values remained at the level of pure water. In the case of modification with magnesium wire, already during the first 24 hours the medium became alkaline and, despite water replacement, remained at pH ~10 throughout the experiment. As for the conductivity, the changes lessened in time as incubation progressed (FIG. 6). Despite good adhesion, the border between the magnesium wire and the polymer was not sufficiently isolated from the influence of the water environment and was susceptible to fast degradation. The initiated resorption of magnesium wiring can be potentially harmful to the surrounding tissue.

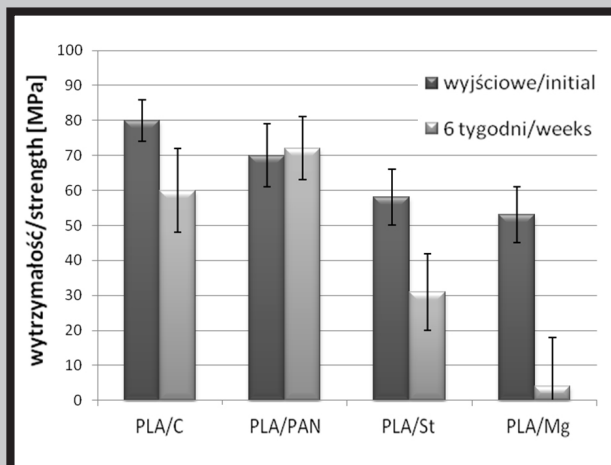


RYS. 7. Zmiany masy płytek zespalających po inkubacji.

FIG. 7. Changes to plate mass after incubation.

Mimo niewielkich zmian pH i przewodności dla pozostałych płytek zespalających widoczne jest, że wszystkie kompozycje są podatne na działanie środowiska wodnego. Dla wszystkich materiałów obserwuje się przyrost masy (RYS. 7) związany przede wszystkim z wbudowywaniem wody w strukturę polimeru. Efekt ten jest najlepiej widoczny dla polimeru modyfikowanego włóknem węglowym, co można powiązać z obecnością największej ilości granic rozdziału faz włókno-osnowa, a tym samym ułatwioną penetracją medium i przyspieszeniem degradacji polimeru.

O degradacji płytek świadczą również zmiany wytrzymałości zespołów realizowanych za ich pomocą. Po sześciotygodniowej inkubacji (czyli minimalnym czasie odpowiadającym uzyskaniu pierwotnego wzrostu kostnego) właściwości mechaniczne płytek pogarszają się w różnym stopniu zależnie od składu (RYS. 8). Największy spadek wytrzymałości widoczny jest dla płytek modyfikowanych drutem magnezowym. Degradujący drut, który podobnie jak polimer stał się kruchy, ulega zerwaniu przy niewielkim obciążeniu i jednocześnie, zmniejszając udział polimeru na przekroju poprzecznym, powoduje osłabienie materiału kompozytowego. Płytkę PLA/Mg pęka przy pierwszym otworze mocującym, a więc podobnie jak w przypadku płytki wykonanej z czystego polimeru. Dla płytki z drutem stalowym widoczny jest również znaczny spadek wytrzymałości, na poziomie 50%, po inkubacji w środowisku wodnym. Należy przypomnieć jednak, że próbki PLA/St badane były ze względu na uzyskanie wartości porównawczych, a nie możliwe potencjalne zastosowanie w praktyce klinicznej. Drut stalowy, po całkowitej resorpcji matrycy polimerowej musiałby zostać z organizmu usunięty i z tego powodu nie spełnia postawionego w celu tych badań warunku o całkowitej biowchłaniałości implantu. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano dla płytek modyfikowanych włóknami. W przypadku włókien poliakrylonitrylowych nie odnotowano spadku wytrzymałości płytek po 6 tygodniowej inkubacji, zaś dla włókien węglowych wytrzymałość obniżyła się o ok. 25% osiągając wartość 60 MPa, tj. wyższą niż wyjściową płytek modyfikowanych drutami.



RYS. 8. Zmiany wytrzymałości na rozciąganie płytek zespalających w układach płytka-drewno po 6 tygodniowej inkubacji w środowisku wodnym.

FIG. 8. Changes of the rupture force in tensile strength tests on plate-connected setups.

The manufactured fixation plates, as shown in the performed tests, were susceptible to the influence of water environment. For all analysed materials, a mass increase was observed (FIG. 7) related primarily to the process of incorporating water into the structure of the polymer. The effect was most apparent in the case of polymer modified with carbon fibres, which can be related to the presence of more numerous boundaries between the phases of fibre and groundmass, which facilitated penetration of the medium and degradation of the polymer.

Degradation of the plates is also evidenced by changes in the strength of the fixations they constitute. After the six week incubation (which reflects the minimum time needed for primary bone union to take place) the mechanical characteristics of the plates deteriorated to a varying degree, depending on the material combination (FIG. 8). The most significant decrease was observed in plates modified with magnesium wire. The degrading wire became brittle as well as the polymer and ruptured at relatively low loads. Moreover, as it reduced the amount of polymer present in the transverse section, it actually weakened the composite material. The plate, similarly to pure polymer, ruptured at the first screw-hole. Steel wire reinforced samples, after incubation in distilled water, have rather low tensile strength. It decreased of 50%. It has to be kept in mind that PLA/St samples were tested for comparison purposes only not for potential medical application. Steel wire, after the polymer is completely resorbed, remains in the body and needs to be removed. Because of the necessity of the reoperation such composite implant can not be considered as a fully bioresorbable and does not fulfil requirements of conducted research. The best results were obtained for carbon and polyacrylonitrile fibres. After six week incubation no tensile strength decrease of PLA/PAN and very low decrease (-25%) of PLA/C were observed. The tensile strength of PLA/C achieved value of 60 MPa what is higher than tensile strength of "green samples" modified with wires.

1. Zaproponowane kompozycje polimer-faza wzmacniająca mogą stanowić ciekawe rozwiązanie w przypadku zespawania kości drobnych, zwłaszcza u małych zwierząt. Dzięki znacznie korzystniejszej charakterystyce naprężeniowo-odkształceniowej oraz lepszym parametrom mechanicznym mogą one stanowić alternatywę dla płytek wykonanych z czystych polimerów.

2. Spośród badanych materiałów zdecydowanie lepsze parametry mechaniczne uzyskano w przypadku zastosowania fazy wzmacniającej w postaci włókien niż drutów. Dodatkową zaletą wprowadzenia fazy włóknistej jest korzystniejszy rozkład naprężeń i odkształceń w obrębie otworów mocujących i wynikający z tego sposób przenoszenia obciążeń podczas jednoosiowego rozciągania.

3. Badania mechaniczne wskazują, iż włókna nadają kompozytowi pewien stopień sprężystości. Mimo spękań osnowy nie dochodziło do całkowitego rozdzielenia dystalnych części płytek.

4. Kolejny etap badań powinien obejmować dobór optymalnych udziałów faz wzmacniających, optymalizację metody otrzymywania płytek oraz ocenę biogodności opracowanych materiałów, a także badanie implantów w schemacie trójpunktowego zginania i skręcania.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach badań statutowych 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Conclusions

1. The proposed polymer-phase compositions may offer interesting solutions in the treatment small bones fractures, particularly in small animals. With their superior stress-strain characteristic and better mechanical parameters, they may offer a viable alternative to pure polymer plates.

2. Among the tested materials, decidedly better mechanical parameters were observed for phases reinforced with fibres, rather than wires. An additional benefit of the introduction of the fibrous phase was a better distribution of stress and strain around the screw-holes and the resulting improvement of load distribution during axial tensile tests.

3. Mechanical tests indicated that fibres provided the composite with a certain degree of elasticity. Despite cracks in the groundmass the distal parts of the plates were not completely separated.

4. The subsequent stage of the research ought to pertain to establishing the optimum fractions of the reinforcement phases, optimising the method of plate production, verifying the biocompatibility of the studied materials and widen range of mechanical testing (eg. 3pts. bending and torsion).

Acknowledgements

This work was financed by statutory research 11.11.160.616 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

Piśmiennictwo

- [1] Rose B.W., Pluhar E.G., Novo R.E., Lunos S.: Biomechanical Analysis of stacked plating technique to stabilize distal radial fractures in small dogs. *Vet Surg* 38 (2009) 954-960.
- [2] Unthoff H.K., Poitras P., Backman D.S.: Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. *J Orthop Sci* 11 (2006) 118-126.
- [3] Szaraniec B.: Durability of Biodegradable Internal Fixation Plates. *Mat Sci Forum* 730-732 (2013) 15-19.
- [4] Morawska-Chochół A., Jaworska J., Chłopek J., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Paluszkiwicz C., Bajor G.: Degradation of poly(lactide-co-glycolide) and its composites with carbon fibres and hydroxyapatite in rabbit femoral bone. *Polymer Degradation and Stability* 96 (2011) 719-726.

References

- [5] Bähr W., Stricker A., Gutwald R., Wellens E.: Biodegradable osteosynthesis material for stabilization of midface fractures: experimental investigation in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 27 (1999) 51-57.
- [6] Eglin D., Alini M.: Degradable polymeric materials for osteosynthesis: tutorial. *Europ Cells and Materials* 16 (2008) 80-91.
- [7] Saikku-Backstrom A., Raiha J.E., Valimaa T., Tulamo R.M.: Repair of radial fractures in toy breed dogs with self-reinforced biodegradable bone plates, metal screws and light-weight external coaptation. *Vet Surg* 34 (2005) 11-17.
- [8] Biewener A., Bertram J.: Mechanical loading and bone growth in vivo. *Bone* 7 (1993) 1-36.
- [9] Reilly D.T., Burstein A.H.: The mechanical properties of cortical bone. *J Bone Joint Surg* 56 (1974) 1001-1022.

1. Dotyczy artykułu / for the paper:

J. Gajowy, A. Niemczyk, M. El Fray: Wstępna ocena budowy chemicznej i struktury fazowej nowych samoorganizujących się poli(arylano-estrów) jako systemów dla kontrolowanego uwalniania leków / Preliminary investigations of chemical and phase structure of poly(arylane-ester) self-assemblies as potential drug delivery systems. *Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów* 112 (2012) 6-11.

Powinno być / Should read:

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki (2011/03/B/ST8/06353).

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Science Center (2011/03/B/ST8/06353).

2. Dotyczy artykułu / for the paper:

J. Kolmas, E. Olędzka, M. Sobczak, G. Nałęcz-Jawecki: Hydroksyapatyt modyfikowany jonami selenianowymi (IV) – nowy materiał o potencjalnym znaczeniu biomedycznym / Hydroxyapatite doped with selenite ions – a new material for potential biomedical applications. *Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów* 122-123 (2013) 10-11.

Należy dodać / Should be added:

Podziękowania

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego (NCN DEC-2011/03/D/ST5/05793: „Opracowanie oraz badanie właściwości kompozytu polimerowo-apatytowego zawierającego selen oraz bisfosfoniany”).

Acknowledgments

This work was supported by the research programme (Project NCN DEC-2011/03/D/ST5/05793 “Development and characterization of polymer-apatite composite containing selenium and bisphosphonates”) of the National Science Centre of Poland.



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/biomaterialy-materialy-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.	