ENGINEERING OF BIOMATERIALOW

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 126 Numer 126 Volume XVII Rok XVII

JULY 2014 LIPIEC 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 Górniczo-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



BI MATERIALS

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 - WROCŁAW 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 - Białystok Technical University, Poland Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY Małgorzata Lewandowska-Szumieł - Medical University of Warsaw, Poland Jan Marciniak - Silesian 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 - WROCŁAW 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

BI MATERIALS

Wskazówki dla autorów

.

1. Prace do opublikowania w kwartalniku "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.

4. Struktura artykułu:

TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo

5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. 6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa

w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany. 7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem. 8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.

9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.

10. Adres redakcji:

Czasopismo

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

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

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać 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). Highresolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.

8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.

9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.

10. Address of editorial office:

Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61 tel./fax: (48) 12 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

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

Subscription terms

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



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

www.biomat.agh.edu.pl







ENGINEERING OF BI MATERIALS

SPIS TREŚCI

CONTENTS

SYMULATORY CHIRURGII MAŁOINWAZYJNEJ Zbigniew Małota, Zbigniew Nawrat, Wojciech Sadowski 2	MINIMALLY INVASIVE SURGERY SIMULATION, TRAINING STATION Zbigniew Małota, Zbigniew Nawrat, Wojciech Sadowski 2
WSTĘPNA OCENA WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNO-	PRELIMINARY STUDY OF STRUCTURAL-
-ELEKTRYCZNYCH W ZAKRESIE NISKICH	ELECTRICAL PROPERTIES IN THE LOW FREQUENCY
CZĘSTOTLIWOŚCI BIOMATERIAŁOWEGO	RANGE OF EXPERIMENTAL BIOMATERIAL MODELS
MODELU DOŚWIADCZALNEGO KOŚCI DŁUGICH	OF LONG BONES IN A PATHOLOGICAL STATE
W STANIE PATOLOGICZNYM	BYOTADD LIVE STRUMM, TOWARD COMPARY
Mariusz Winiecki 10 Masz Czapski, 12	Mariusz Winiecki 12
WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA	INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATION ON
WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE TYTANU	PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF TITANIUM
STOSOWANEGO NA IMPLANTY	USED FOR BLOOD-CONTACTING IMPLANTS
DO KONTAKTU Z KRWIĄ	ANITA KAJZER, ZBIGNIEW PASZENDA, MARCIN BASIAGA,
Anita Kajzer, Zbigniew Paszenda, Marcin Basiaga,	WITOLD WALKE, WOJCIECH KAJZER 23
Witold Walke, Wojciech Kajzer 23	SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION
SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA HYDROŻELOWYCH	OF HYDROGEL CHITOSAN/LAPONITE
NANOKOMPOZYTÓW CHITOZAN/LAPONIT	NANOCOMPOSITES FOR BONE TISSUE
DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ	ENGINEERING
Krzysztof Pazdan, Kinga Pielichowska,	Krzysztof Pazdan, Kinga Pielichowska,
Karol Gryń, Jan Chłopek 31	Karol Gryń, Jan Chłopek 31

Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

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

SYMULATORY CHIRURGII MAŁOINWAZYJNEJ

ZBIGNIEW MAŁOTA*, ZBIGNIEW NAWRAT, WOJCIECH SADOWSKI

Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii im. prof. Zbigniewa Religi ul. Wolności 345a, 41-800 Zabrze * e-mail: zmalota@frk.pl

Streszczenie

Współczesna medycyna wymaga od lekarzy sprawnego korzystania z nowych technik chirurgicznych. Chirurgia laparoskopowa pomimo wielu zalet ma ograniczenia związane przede wszystkim z utrudnionym dostępem do wybranych narządów jamy brzusznej oraz ograniczonym ruchem narzędzia. Proste czynności manualne takie jak szycie czy cięcie wykonywane laparoskopowo są o wiele trudniejsze i pracochłonne, dlatego wymagają dodatkowego szkolenia. Symulatory stają się ważną, integralną częścią szkolenia chirurgicznego i w sposób zasadniczy wpływają na przebieg, czas trwania operacji oraz powikłania śródoperacyjne. W Fundacji Rozwoju Kardiochirurgii już od wielu lat powstają unikalne stanowiska treningowe, które z powodzeniem są wykorzystywane do nauki nowych technik operacyjnych w czasie warsztatów chirurgicznych BioMedTech Silesia. Stanowiska treningowe operacji laparoskopowych wymagają jak najwierniejszego odwzorowania zarówno geometrii pola operacyjnego jak i właściwości fizycznych naturalnych tkanek. Procedurę przygotowania takich specjalistycznych symulatorów należy rozpocząć od analizy anatomii i właściwości fizycznych modelowanych organów oraz doboru materiałów potrzebnych do ich odtworzenia.

W artykule przedstawiono możliwości zastosowania tworzyw sztucznych w symulatorach chirurgii małoinwazyjnej zarówno w celu modelowania anatomii ciała, modelowania właściwości fizycznych naturalnych tkanek jak i umożliwienia interakcji między narzędziami i tkankami podczas podstawowych czynności manualnych wykonywanych w czasie operacji.

Słowa kluczowe: symulatory chirurgii małoinwazyjnej, platformy testowe, medyczne fantomy, badania materiałowe

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 2-11]

W nauczaniu chirurgii endoskopowej wiele początkowych

Wstęp

problemów związanych jest z utratą widzenia głębi, ograniczonym dostępem do wybranych narządów jamy brzusznej, ograniczeniem ruchów i zmianą kinematyki ruchu narzędzia wynikającą z dodatkowego punktu podparcia narzędzia w miejscu portu oraz wykorzystaniem nowych instrumentów. Stanowiska treningowe do wideochirurgii, symulatory umożliwiającą praktyczną naukę umiejętności manualnych oraz symulację medycznych procedur i nowoczesnych technik chirurgii laparoskopowej i w sposób zasadniczy mogą wpływać na przebieg, czas trwania operacji oraz powikłania śródoperacyjne. Fundacja Rozwoju Kardiochirurgii (FRK) jest znanym ośrodkiem badawczym z zakresu robotyki chirurgicznej, w którym powstają prototypy robotów Robin Heart i unikalne narzędzia mechatroniczne. Obecnie FRK jest również partnerem projektu StiffFlop, którego celem jest opracowanie biologicznie inspirowanego, elastycznego,

MINIMALLY INVASIVE SURGERY SIMULATION, TRAINING STATION

ZBIGNIEW MAŁOTA*, ZBIGNIEW NAWRAT, WOJCIECH SADOWSKI

FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT UL. WOLNOŚCI 345A, 41-800 ZABRZE, POLAND * E-MAIL: ZMALOTA@FRK.PL

Abstract

In endoscopic surgery skill acquisition many of the initial challenges are related to a loss of depth perception, the fulcrum effect and the use of new, different instruments. Simulation is a promising technology as a tool for endoscopic training and new kind of surgical tools introducing education. Foundation of Cardiac Surgery Development (FCSD) is known as a research centre for surgical robotics. The Robin Heart robot and mechatronics tools are being developed for the first clinical application. FCSD is also a partner now in Stiff Flop project focused on a new kind of robot which is bio-inspired by octopus anatomy. To support the educational process, the virtual operating room for planning the surgery and training station have been prepared by FCSD Biocybernetics Laboratory team. Organized over 12 years in FCSD Surgical Workshop created possibilities for testing our devices and to improving educational methodology for training young adepts in surgery. The most important in obtaining the appropriate surgical simulation is creation of the quasi natural geometry of surgical scene and physical characteristics of used materials. Simulators and training models fall into three broad categories: virtual reality (VR) trainers, box or mechanical trainers and biological models for testing and training surgery have been designed and used. The procedures of preparation of these specialized devices started form analysis of anatomy and physical characteristics of operated tissue. In the next step artificial materials have been chosen for preparation of the appropriate model.

In the article the authors show the process of producing the surgical training stations and few examples of the latest realized specialized devices. The paper presents the possibilities of application of artificial materials in simulators to allow realistic interactions between surgical instruments and soft tissues, including deformations during basic manual operations like cutting or sewing. These platforms allow geometric modelling of the body anatomy, but also the modelling of the physical properties of the living tissues.

Keywords: minimally invasive simulators, benchmark platform, medical phantom, materials research

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 2-11]

Introduction

Minimally invasive surgical procedures are very complex motion sequences that require a high level of preparation and surgical skills training. New tools developed for the use of new medical procedures also require an early test. Benchmarking is an essential part of the design of prototypes. There are many types of simulators that are available for surgical skills training and devices testing. o kontrolowanej sztywności i uczącego się manipulatora do operacji małoinwazyjnych. Organizowane od 12-lat w FRK chirurgiczne warsztaty stwarzają możliwości przetestowania naszych urządzeń i optymalizacji metodologii nauczania młodych adeptów w chirurgii. Stworzenie funkcjonalnych symulatorów wymaga odtworzenia naturalnej geometrii pola operacyjnego (sceny chirurgiczne) zawierającego materiały o właściwościach fizycznych zbliżonych do naturalnych tkanek. Wraz z rozwojem nowych technik leczenia powstało zapotrzebowanie na stworzenie nowych rodzajów symulatorów, trenażerów. Symulatory wpływają na poprawę bezpieczeństwa pierwszych wykonywanych przez chirurga operacji oraz dają również możliwość kontroli nabytych podczas szkolenia umiejętności przez nadzorującego chirurga oraz pozwalają na ilościową ocenę np. ekonomiki i celowości ruchów, czasu, liczby popełnionych błędów itp. Oczekuje się, że w przyszłości symulatory chirurgiczne umożliwiać będą programowanie sytuacji kryzysowych powikłań śródoperacyjnych, zdarzeń niepożądanych, anomalii anatomicznych itp.

Obecnie używane trenażery do chirurgii małoinwazyjnej można podzielić na kilka grup [1-5]:

- warsztatowe (bench model),
- typu box (video box, Screen-Based Simulations),
- oparte na sztucznych modelach (Synthetic, inanimate),
- wirtualne (Virtual reality, computer-based models),
- typu AR (Augmented reality, oparte na rozszerzonej rzeczywistości wirtualnej),
- hybrydowe,
- zrobotyzowane,
- zwierzęce,
- ex vivo (Ex vivo animal tissue models),
- in-vivo (Cadaveric models).

Według [6] zabiegi małoinwazyjne (laparoskopowe) można podzielić na 3 kategorie w zależności od stopnia trudności i funkcjonalności wykonywanych czynności: diagnostyczne, operacyjne o małym stopniu zaawansowania oraz zaawansowane zabiegi proceduralne.

Trenażery wideochirurgiczne można również podzielić według realizowanych zadań na dwie grupy [7]:

- trenażery zadań częściowych, które mają na celu zapewnienie nabycia umiejętności istotnych i niezbędnych do wykonywania różnych operacji. Pozwalają na rozwój koordynacji wzrokowo-ruchowej podczas typowych, podstawowych manualnych czynności jak szycie, cięcie, robienie pętli itp.,
- trenażery zadań ogólnych, które symulują całe złożone procedury chirurgiczne zwykle składające się z kilku zadań częściowych (np. cholecystektomii).

Ze względu na rodzaj modeli i stopień uproszczenia modeli trenażery możemy wyróżnić symulatory o różnej wierności odwzorowania pola operacyjnego. Modele różnią się w odniesieniu do ich poziomu wierności lub realizmu, w porównaniu z realnym pacjentem. Wierność symulatora określa stopień, w jakim są odwzorowane cechy naturalnego obszaru operacji, takie jak funkcje wzrokowe, słuchowe, funkcje dotykowe (właściwości mechaniczne) funkcje percepcyjno-motoryczne, możliwości reakcji (sprzężenia) i współdziałania z operatorem [8]. Pierwsza generacja symulatorów oparta jest tylko na anatomii, częściowo geometrii struktury biorącej udział w interwencji chirurgicznej. Druga generacja symulatorów zawiera nie tylko geometryczne modele anatomii ciała, ale również modele fizyczne właściwości żywych tkanek. Wprowadzenie biomechanicznych właściwości jest niezbędne, aby wprowadzić realistyczne interakcje między narzędziami chirurgicznymi a tkankami miękkimi w czasie ich cięcia czy deformacji. Trzecia generacja symulatorów pozwala połączyć anatomiczne, fizyczne i fizjologiczne cechy modelowania funkcji niektórych układów organicznych takich jak systemy sercowo-naczyniowe, układ oddechowy lub pokarmowy.

Simulators can be divided into 2 different groups: high fidelity and low fidelity. These models vary widely with respect to their level of fidelity and realism, as compared with a living human patient. The fidelity of a simulator is determined by the extent to which it provides realism through characteristics such as visual cues, tactile features, feedback capabilities, and interaction with the trainee.

From a variety of simulators we can recognize [1-5]:

- Synthetic (inanimate) models and box trainers, Screen-Based Simulations
- Live animal models
- Cadaveric models
- Ex vivo animal tissue models
- Virtual reality (computer-based) models
- Hybrid simulators
- Procedure-Specific Trainers
- Robotic Simulators

Synthetic models using physical objects usually involve models of plastic, rubber, silicone and latex. These objects are used to render different organs and pathologies and allow a trainee to perform specific tasks and procedures [6]. A box trainer uses the actual instruments and optical system used clinically to manipulate 'synthetic' tissues. Some physical simulators may also reproduce the feedback from surgical environment. Artificial materials can effectively replace the natural bodies (anatomic sections or tissues) from euthanized animals and may provide approximate haptic feedback.

In general, our benchmarking platforms are based on simulators which describe the anatomy, in particular the geometry of the structures involved in a surgical intervention. These platforms allow geometric modelling of the body anatomy, but also the modelling of the physical properties of the living tissues. The implementation of biomechanical properties is necessary to allow realistic interactions between surgical instruments and soft tissues, including deformations and cutting.

Surgical simulators can be classified into three categories, as shown [7,8]:

- first-generation simulators describe only the anatomy, in particular the geometry of the structures involved in a surgical intervention,
- second-generation simulators additionally include the geometric modelling of the physical properties of the living tissues to allow realistic interactions between surgical instruments and soft tissues,
- third-generation simulators combine anatomical, physical, and physiological modelling, for creating some organic systems function such as the cardiovascular, respiratory, or digestive systems.

The modelling of biological tissues for second- and thirdgeneration simulators is very difficult. The biological soft tissues have nonlinear force-deformation properties and show viscous behaviour. The properties of soft tissues are often anisotropic and heterogeneous and show hysteresis, relaxation and creep behaviours. Additionally, they strongly depend on many factors, including temperature, pressure and health and dissected tissue often changes its mechanical properties so literature data may differ greatly from one another. It should also be noted, that the shape and mechanical properties of animal bodies also significantly differ from human organs. Modelowanie tkanek biologicznych dla symulatorów drugiej i trzeciej generacji, jest bardzo trudne. Biologiczne tkanki mają nieliniowe lepkościowo-elastyczne właściwości mechaniczne. Właściwości tkanek miękkich często są anizotropowe i niejednorodne i wykazują zjawiska histerezy, relaksacji i pełzania. Dodatkowo właściwości te silnie zależą od wielu czynników, w tym temperatury, ciśnienia oraz zdrowia, a wypreparowane tkanki często zmieniają swoje właściwości mechaniczne, więc dane z literatury bardzo często mogą znacznie różnić się między sobą. Należy również zauważyć, że kształt organów i właściwości mechaniczne tkanek zwierzęcych także znacznie różnią się od ludzkich.

Materiały i metody

TABELA 1. Podstawowe właściwości mechaniczne wybranych materiałów do budowy modeli w symulatorach chirurgicznych.

TABLE 1. The basic properties of the materials used for the testing platforms.

Materials and methods

Simulators and training models, fall into three broad categories: virtual reality (VR) trainers, box or mechanical trainers and biological models for testing new models and training which have been designed and used. The preparation procedures of these specialized devices started form analysis of anatomy and physical characteristics of operated tissue. In the next step the artificial materials have been chosen for preparation of the appropriate model.

On building our platforms we paid special attention to the internal geometry of the operating field and functionality of minimally invasive procedures. That way we used only generally available materials like silicone and Urethane rubber (Contact Smooth-On, Inc.) with different mechanical properties: Mold Max[®] 30, Mold Max[®] 40, OOMOO[®] 30, Ecoflex[®] 30 Supersoft Silicone, VytaFlex[®] 40, Rebound 25 (TABLE 1). The study of mechanical properties of simulators elements was performed both on the advanced testing system MTS 250 TYTRON and constructed by ourselves computer controlled electromechanical stand (with Mecmesin Advanced Force Gauge AFG 25).

	Ciężar właściwy Specific gravity [g/cm³]	Czas zachowania stanu plastycznego Pot Life [min]	Czas utwardzenia Cure time [godziny/hours]	Barwa Color	Twardość Shore A Hardness	Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [MPa]	Odkształcenie przy zerwaniu Elongation at break [%]	Wytrzymałość na rozdzieranie Die B Tear Strength [N/cm]
Oomoo 30	1.34	30	6	lawendowy / lavender	30A	1.652	250	70.05
Rebound 25	1.14	20	6	pomarańczowy / orange	25A	3.550	690	178.62
Ecoflex 30	1.07	45	4	bezbarwny / translucent	00-30	1.378	900	66.54
MoldMax 30	1.18	45	24	różowy / pink	30A	3.978	300	218.90
MoldMax 40	1.14	45	24	zielony / mint green	40A	3.7927	250	210.15
Vytaflex 40	1.03	30	16	biały / white	40A	3.599	660	143.60

W FRK powstały zarówno funkcjonalne symulatory do wideochirurgii - proste trenażery, które mają na celu zapewnienie nabycia umiejętności istotnych i niezbędnych do wykonywania różnych operacji i pozwalają na rozwój koordynacji wzrokowo-ruchowej podczas typowych podstawowych manualnych czynności jak szycie, cięcie, odpowiednie wprowadzenie i ułożenie narzędzi, uchwycenie tkanki, igły itp., jak i symulatory bardziej złożone - trenażery, oparte na anatomicznych modelach o określonych właściwościach fizycznych, odzwierciedlających rzeczywiste pole operacyjne, które można przystosować do symulacji dowolnej procedury medycznej często zawierające naturalne organy.

Etap projektowania wszystkich symulatorów powinien zawierać zarówno analizę anatomii, jak i właściwości fizycznych wybranych organów i tkanek. Zwrócono szczególną uwagę na wewnętrzną geometrię pola operacyjnego i funkcjonalność procedur małoinwazyjnych. Sceny treningowe zawierają modele sztuczne oraz elementy naturalnych tkanek. Przeprowadzono wstępną analizę doboru materiału, wyboru metodologii wykonania elementów scen treningowych i anatomicznych modeli organów wybranych układów oraz integrację systemu z oprogramowaniem umożliwiającym kontrolę i ocenę nabytych podczas szkolenia umiejętności.

Do opracowania scen treningowych zastosowano ogólnie dostępne materiały produkowane min. przez Contact Smooth-On, Inc., typu silikon lub guma o różnych właściwościach mechanicznych: Mold Max[®] 30, Mold Max[®] 40, OOMOO[®] 30, Ecoflex[®] 30 Supersoft Silicone, VytaFlex[®] 40, Rebound 25 (TABELA 1).

Results and Discussions

Biological vs. artificial materials study

Among many procedures performed in the lower gastrointestinal tract some can be distinguished; surgery on lungs like procedure to remove a lung (pneumonectomy, lobectomy, segmentectomy) [9-10], and surgery on liver like surgical resection of the liver (heatectomy) or liver biopsy [11].

Physical simulators are generally part-task trainers and help to develop the hand-eye co-ordination variety of motor skills and techniques necessary during these operations and including basic manual specific tasks such as cutting, suturing, grasping or clipping.

Because the biological tissue organs (lung and kidney) are very heterogeneous, we decided to investigate the mechanical properties of whole organs too.

We analyzed the effects of different forces during suturing, cutting and clipping applied on these abdominal organs in a phantom model with swine fresh organs exerting a pressure of up to 2.5 N.

Mechanical tests were performed using constructed by ourselves computer controlled electromechanical stand to determine the force – strain characteristics of tested material in continuous or pulsate work.

The biological samples were pressed and stretched (push in/out, puncture, cut) in several places by (FIG. 1):

- disk Φ = 18 mm,
- needle injection Φ = 1.2 mm, I = 40 mm,
- the surgical knife No. 21.

• •

Badania właściwości mechanicznych elementów symulatorów zostały wykonane na zaawansowanej maszynie wytrzymałościowej MTS 250 TYTRON oraz własnej konstrukcji systemie sterowanym komputerowo opartym na mierniku siły Mecmesin Advances Force Gage AFG 25.

Wyniki i dyskusja

Badania organów biologicznych

Wśród częstych małoinwazyjnych procedur medycznych możemy wyróżnić operacje w klatce piersiowej np. usunięcia całego lub części płata płuca (pneumonektomia, loboktomia) [9,10], czy operacje układu pokarmowego takie jak resekcja lub biopsja wątroby [11].

Proste symulatory mają na celu naukę koordynacji wzrokowo-ruchowej podczas typowych podstawowych manualnych czynności wykonywanych w trakcie operacji, takich jak szycie, cięcie, odpowiednie wprowadzenie i ułożenie narzędzi, uchwycenie tkanki, igły itp. Ponieważ tkanka biologiczna (płuco, wątroba) jest bardzo niejednorodna, dlatego zdecydowano się również na zbadanie oddziaływania narzędzi podczas tych manualnych czynności na tkankę całych naturalnych organów. W tym celu została wykonana analiza wpływu siły działającej na płuco oraz wątrobę (aż do 2,5 N) podczas podstawowych czynności manualnych takich jak nacisk, szycie czy cięcie (RYS. 1). Wyniki porównano z wynikami badań materiałów sztucznych wykorzystanych do budowy modeli symulatorów. Określono charakterystykę siła – deformacja podczas:

- nacisku stemplem Φ = 18 mm,
- wbijania igły $\Phi = 1,2$ mm, I = 40 mm,
- nacinania nożem chirurgicznym No. 21 w kilku miejscach.

Zaobserwowano, że w przypadku watroby proces wbijania igły oraz nacinania nożem nie jest jednosta--jny (RYS. 2). Jest to spowodowane prawdopodobnie niejednorodnością tkanki i różną siłą potrzebną do przejścia narzędzia przez kolejne warstwy wątroby o różnych właściwościach mechanicznych. Podczas procesu naciskania stemplem proces ten był niewidoczny. W przypadku płuc, krzywa siła - odkształcenia była bardziej jednostajna. Najmniejszą wartość siły zaobserwowano podczas wbijania igły w wątrobę. Siła potrzebna do ugiecia organu o 25 mm podczas nacisku stemplem w przypadku płuc wynosiła 1,29 N, natomiast w przypadku watroby tylko 0,75 N. Z materiałów sztucznych jedynie Ecoflex 30 i Oomo 30 maja zbliżony kształt charakterystyki. Pozostałe materialy takie jak Rebound 25 wymagają znacznie większej siły w celu uzyskania podobnego odkształcenia jak badane tkanki naturalne.



RYS. 1. Badania wpływu deformacji tkanki podczas podstawowych czynności manualnych.

FIG. 1. The study of kidney deformation during inserting and removing the needle, knife and stamp.

This test was performed with both V = 0.1 mm/s and V = 0.5 mm/s. Some samples were subjected to relaxation, i.e. after reaching the maximum pressure, dynamometer speed dropped to zero and the force was being recorded at all time.

It was observed in FIG. 2, especially in the case of liver, both the insertion of needles and the cutting blade are not uniform. During the study the impact of varying strength to the tissue during passage of the tools through the various layers (with different mechanical properties) of the liver was clearly observed. At the time of pulling out the tool, this phenomenon is practically not observed. Whereas for the lung more uniform curve during both putting and pulling occurred.

The forces required to insert the disk to a depth of approximately 25 mm is the smallest for lungs, about 1.29 N. In the case of liver about 0.75 N was obtained. From artificial materials only Ecoflex 30 and Oomoo 30 receive similar values.



RYS. 2. Porównanie siły deformacji badanych materiałów podczas nacisku, wbijania igły oraz nacinania nożem ze stałą prędkością wykonywania tych czynności (V = 0,1 mm/s).

FIG. 2. The comparison of material deformation during inserting the needle, knife and disk stamp (V = 0.1 mm/s).

BI MATERIALS

5

Przykłady scen treningowych

Na podstawie wybranych małoinwazyjnych procedur medycznych zostały zdefiniowane podstawowe sceny treningowe oraz zaprojektowane i wykonane stanowiska badawcze i obiekty odwzorowujące organy o różnych właściwościach mechanicznych. Zaprojektowano symulatory, które modelują anatomiczne i fizyczne cechy naturalnych układów takich jak: układ trawienny czy układ pokarmowy.

Zaprojektowano również trenażer funkcjonalny – odwzorowujący głównie wybrane cechy medycznych procedur i umożliwiający naukę podstawowych czynności manualnych. Oba systemy pozwalają na interakcję pomiędzy narzędziem a tkanką podczas symulacji operacji.

Przykład 1: układ trawienny (operacje jelita)

TABELA 2. Wymiary próbek jelita. TABLE 2. The dimensions of the colon samples.

No.	Próbka Sample	Szerokość Width [mm]	Grubość Thickness [mm]
1		10	0.92
2	Kierunek osiowy Axial	10	0.84
3	7000	10	0.94
4	Kierunek	10	0.91
5	promieniowy	10	1.00
6	Radial	10	0.86
7	Pierścień/Ring (diameter of 35 mm) (średnica 35 mm)	10	0.90

Platforma anatomiczna została zaprojektowana w celu symulacji medycznych procedur wykonywanych m.in. w układzie trawiennym. Wśród najczęściej wykonywanych procedur możemy wyróżnić operacje odbytu oraz resekcje jelita grubego Proctocolectomy [12]. Dlatego jednym z głównych elementów naszego symulatora jest jelito grube. Test został przeprowadzony na naturalnym świńskim jeli-

cie, które zostało pobrane w zakładzie przetwórstwa mięsnego H.A.M. SJ w Radzionkowie. Z wypreparowanego jelita zostały przygotowane próbki o długości 10 cm i średnicy 3,5 cm. Badania zostały przeprowadzone na próbkach wyciętych w kierunku osiowym oraz promieniowym. Dodatkowo przeprowadzono badania całego pierścienia jelita, które poddano cyklowi rozciągania powtarzanego 500 razy. Podstawowe wymiary badanych próbek naturalnego jelita przedstawiono w TABELI 2.

Badania właściwości mechanicznych wykonano na zaawansowanej maszynie wytrzymałościowej TYTRON 250 firmy MTS (RYS. 3).

RYS. 3. (a), (b) Maszyna wytrzymałościowa MTS 250 TYTRON, (c) Rozciąganie osiowej próbki jelita, (d) Rozciąganie pierścienia jelita.

FIG. 3. (a), (b) Testing system - MTS 250 TYTRON, (c) Axial tensile of intestine sample, (d) Tensile of intestine sample ring during fatigue test.

The examples of surgical scene building

Based on some minimally invasive procedures essential benchmarking scenarios have been defined and designed along with fabrication of special test rigs and objects (such as phantoms representing organs with variable stiffness). The simulators combining anatomical, physical, and physiological modelling of the functions of some organ systems such as the cardiovascular or digestive systems. There is an additional degree of complexity due to the coupled nature of physiological and physical properties.

There are two types of test stands designed and manufactured:

- Anatomical mainly based on the anatomical model reflecting the real geometry of the bodies,
- Benchmarking platform mainly reflecting functional characteristics for a medical procedures including the obstacle track for training and evaluation of surgical skills.

Both models allow to study the interactions between surgical instruments and soft (hard) tissues during deformations and cutting.

Example 1: gastrointestinal tract (colon surgery)

The platform will allow to simulate medical procedures performed in the lower gastrointestinal tract. Among the most common operations such as the surgical removal of the rectum and all or part of the colon Proctocolectomy [12]. Therefore one of the main organs of our platform is intestine. Tests were carried out with the use of natural porcine tissue (large intestine) as an element phantom and benchmarking platform. Tissues were received at the Department of Meat HAM, located in Radzionków. The starting sample material was cut of about 10 cm lengths and 3.5 cm of diameter. The tests were performed on samples cut in the axial and radial direction. Additionally, a part of tubes intestine (ring) which were of 500 times cyclic stretching were tested. Dimensions of samples are shown in TABLE 2.

The study of mechanical properties was performed on the advanced testing system MTS 250 TYTRON (FIG. 3).



6



RYS. 4. Charakterystyki obciążenie - odkształcenie odzwierciedlające typowe właściwości plastyczne próbek: (a) w kierunku osiowym, (b) pierścienia jelita, uzyskane podczas badań na maszynie MTS 250 TYTRON.

FIG. 4. Load - strain curves showing typical yield behaviour for: (a) axial sample, (b) ring sample of intestine obtained during research on testing system MTS 250 TYTRON.

Na podstawie charakterystyki obciążenie-odkształcenie (RYS. 4) zostały oszacowane podstawowe parametry mechaniczne jelita wraz z modułem elastyczności. Wyniki przedstawiono w TABELI 3.

Sztuczne modele symulatora zostały wykonane z kauczuku uretanowego Smooth-On's Brush-On® Series High Tear Strength Brushable Urethane Rubber rubbers oraz kauczuku silikonowego Rebound® Self Thickening Brush-On Silicone Rubbers (RYS. 5). Są to materiały niezwykle wszechstronne i słyną z wysokiej odporności na ścieranie i wytrzymałości na rozdarcie. Pozwalają na bardzo dokładne odwzorowanie kształtu. Na RYS. 6 przedstawiono porównanie właściwości wybranych kauczuków z właściwościami tkanki biologicznej.

Model symulatora odzwierciedla anatomiczny kształt układu trawiennego, w którym pole operacyjne jest powierzchnią brzucha zdefiniowaną poprzez dwie linie biegnące wzdłuż brzegów bocznych mięśni prostych brzucha i linii podżebrowej i międzykolcowej (RYS. 7). Zewnętrzna powierzchnia jest wykonana z elastycznego silikonu o grubości 3 mm i przykrywa obszar nadbrzusza, pępka i pachwiny. Powierzchnia brzucha może być również zbudowana z kilku warstw o różnych właściwościach mechanicznych, na wzór naturalnej tkanki brzucha. Może składać się z 4-ch warstw odwzorowujących skórę, tkankę podskórną, warstwę powięziowo-mięśniową oraz otrzewną. Based on the slope of the straight-line portion of the loadstrain diagram (FIG. 4) the modulus of Elasticity or Young's of Elasticity or Young's Modulus was calculated. The results are shown in TABLE 3.

The artificial models were made of Smooth-On's Brush-On® Series High Tear Strength Brushable Urethane Rubber rubbers and Rebound® Self Thickening Brush-On Silicone Rubbers (FIG. 5). These materials are extremely versatile and are famous for their abrasion resistance and high tear strength. They have the convenience of one-to-one mix ratio and are easy to mix and apply with a brush or spatula. Brush-On® polyurethane rubber paints onto vertical surfaces without sagging and will cure with negligible shrinkage to durable rubbers that perform and last in production. Each will capture exact detail from any original model. Brush-On® 40 is used for models with deep undercuts for reproducing sculpture.

The FIG. 6 shows the comparison of rubber properties with properties of biological tissue.

Model based on the anatomical shape of gastrointestinal tract include the abdominal surface defined by subcostalis and interspinalis lines and two lines set along lateral edges of straight muscles of the abdomen (FIG. 7). The outer surface is made from flexible silicone of 3 mm thickness and covers an area of epigastric, appropriate umbilical and inguinal regions. The abdominal elastic surface may consist of several layers like real abdominal wall. The abdominal wall consists of three muscles layers; from outside to inside, these include the external oblique, internal oblique, and transversus abdominis muscles. Deep to the transverses abdominis muscle is the peritoneum and bowel.

Phantom outer layer is removable to allow the installation of the trocar at any point of surface depending on the type of surgery procedures. The additional natural or artificial organs (such as the pelvis to the spine, large intestine, small intestine, blood vessels can be placed inside the model in any configuration. The organ elements and any measurement sensors can be attached to a special movable frame made from aluminium profiles.

TABELA 3. Podstawowe parametry mechaniczne jelita. TABLE 3. The study results of the mechanical properties of the intestine.

Próbka Sample		Moduł Younga Young's Modulus [MPa]	Wydłużenie w piku Strain at peak %	Maksymalne obciążenie Peak load [N]	Maksymalne naprężenie Peak stress [MPa]	Energia zerwania Energy to break [J/m²]	Energia do piku Energy to peak [Nmm]	Liczba próbek Number of probes
Osiowa	Średnia Mean	3.417	30.511	2.678	0.3	1692.493	4.998	2
Axial	Odch. st. Std. Dev.	1.593	12.015	0.353	0	399.148	2.802	3
Promie-	Średnia Mean	2.086	35.471	2.676	0.3	1895.57	6.319	2
Radial	Odch. st. Std. Dev.	0.488	20.618	0.742	0.1	498.524	3.133	3
Pierścień Ring	Średnia Mean	2.494	63.831	4.854	0.5	****	47.765	1
Pierścień Ring fatigue test badania zmęczeniowe	Średnia Mean	5.373	29.615	4.598	0.5	3248.04	24.704	1



RYS. 5. Modele jelita grubego: (a) naturalne świńskie, (b) wykonane z Smooth-On's Brush-On[®] - high tear strength brushable Urethane Rubber, (c) wykonane z Rebound[®]- self thickening Brush-On Silicone Rubbers.

FIG. 5. The models of large intensive: (a) porcine, (b) Smooth-On's Brush-On[®] - high tear strength brushable Urethane Rubber, (c) Rebound[®]- self thickening Brush-On Silicone Rubbers.

Warstwa zewnętrzna fantomu jest wymienna w celu umożliwienia w dowolnym miejscu montażu trokarów narzędziowych w zależności od symulowanej procedury medycznej. Dodatkowe organy np. miednica kręgosłup, jelito grube, jelito cienkie, naczynia krwionośne, mogą być umieszczane w wewnątrz platformy w dowolnej konfiguracji. Elementy narządów, jak również czujniki pomiarowe są mocowane do ruchomego stelaża wykonanego z profili aluminiowych.

Anatomiczny model może być wykorzystany do symulacji operacji takich jak:

- kolonoskopia metoda badania dolnego odcinka przewodu pokarmowego (jelita grubego), sigmoidoskopia – badanie części jelita grubego - odbytnicy, esicy i części zstępnicy.
- kolektomia częściowe lub całkowite chirurgiczne usunięcie jelita grubego.
- proktokolektomia usunięcie jelita grubego razem z odbytnicą.

Kolejnym rodzajem symulatora jest uniwersalny, wielopoziomowy (wielowarstwowy) moduł przeznaczony do systemów treningowych chirurgii małoinwazyjnej (wideochirurgii) (RYS. 8). Moduł składa się z wielu wymiennych warstw w postaci płaszczyzn ułożonych jedna nad drugą, na których odwzorowywane są podstawowe cechy anatomiczne (geometrii) oraz właściwości mechaniczne dowolnych organów (układów narządowych) w celu modelowania przestrzeni operacyjnej (3D) wykorzystywanej w wybranym zabiegu chirurgii małoinwazyjnej.



RYS. 6. Porównanie modułu sprężystości naturalnego jelita z wybranymi sztucznymi. FIG. 6. The tensile modulus comparison of porcine intestine with some artificial materials.

The main anatomical areas for this model may be applied to:

- colonoscopy or sigmoidoscopy for the endoscopic examination of the large bowel and the distal part of the small bowel with optic camera passed through the anus for a visual diagnosis and for biopsy or removal of suspected colorectal cancer lesions.
- proctocolectomy for the surgical removal of the rectum and all or part of the colon.
- Colectomy for the surgical resection of any extent of the large intestine (Colon resection).



RYS. 7. Model anatomiczny. FIG. 7. Anatomical model.

8

Wielopoziomowy system stworzony jest z wielu wymiennych warstw, których odpowiednie ułożenie w pionie pozwala na przestrzenne odtworzenie cech anatomicznych (geometrii) oraz właściwości mechanicznych dowolnych organów. Poszczególne warstwy mogą zawierać zarówno:

- odwzorowywane anatomiczne przekroje organów uzyskane z obrazów tomograficznych CT (MRI) (z różnych kierunków projekcji). Odtworzenie obrazów polega na wycięciu odpowiednich konturów 2D na poszczególnych warstwach odtworzonych na podstawie obrazów CT (MRI).
- elementy, które odwzorowują wybrane cechy anatomiczne (geometryczne) i funkcjonalne organów poprzez odpowiednie rozmieszczenie brył geometrycznych o dowolnych kształtach (nie tylko anatomicznych) i właściwościach elastycznych.
- naturalne organy oraz elementy układów narządowych

Ułożenie warstw jedna nad drugą odwzorowuje całą geometrię przestrzenną 3D organizmu ludzkiego (głównie objętość operacyjną tułowia) i właściwości mechaniczne symulowanych organów oraz układów narządowych (np. układu krążenia). System w zależności od symulowanej operacji (procedury medycznej) może odwzorowywać pojedynczy organ, układ narządowy jak i cały tułów wraz z powłoką brzuszną oraz wieloma organami i układami narządowymi. Podstawowe warstwy mogą być wykonane z mat silikonowych, kauczukowych lub gumowych o różnych grubościach i właściwościach mechanicznych.

Właściwe ułożenie trokarów w celu wprowadzenia narzędzi oraz kamery endoskopowej umożliwia system nawigacyjny. System ten zawiera jedną (zewnętrzną) warstwę, na którą nanoszony jest obraz (poprzez optyczną projekcję) powłoki brzusznej lub siatki pomiarowej w celu nawigacji narzędzi oraz endoskopu. Takie rozwiązanie pozwala na odwzorowanie złożonych kształtów geometrii uwzględniając takie cechy jak funkcje wzrokowe, funkcje dotykowe (właściwości mechaniczne), funkcje percepcyjno-motoryczne, możliwości reakcji (sprzężenia) i współdziałania z różnymi narzędziami. Na wybranych warstwach dodatkowo można rozmieszczać naturalne organy, co pozwala na zwiększenie realizmu operacji. System jest bardziej uniwersalny od dotychczasowo stosowanych trenażerów. Pozwala na dowolne kształtowanie objętości operacyjnej w przestrzeni 3D.

Ruchome i wyjmowane poziomy pozwalają min. na:

- odwzorowanie naturalnej tkanki (np. warstwy skóry) składającej się z wielu warstw o różnych właściwościach mechanicznych i różnej grubości,
- warstwowe odwzorowanie organów (tworzenie modeli) na podstawie skanów CT,
- odwzorowanie wybranych cech geometrycznych, funkcjonalnych organów poprzez ułożenie z brył o dowolnych kształtach i właściwościach elastycznych scen treningowych na poszczególnych warstwach elementów,
- jednoczesne zastosowanie (na różnych warstwach) elementów zarówno z naturalnej tkanki, jak i dowolnego materiału sztucznego,
- zastosowanie dowolnej ilości warstw, rozłożonych dowolnie w przestrzeni,
- symulowanie np. odmy otrzewnowej poprzez rozsunięcie warstw,
- możliwość dodatkowego podglądu bocznego zastosowanie dodatkowej kamery rejestrującej cały zabieg od momentu wkładania narzędzi do momentu ich ostatecznego ich usunięcia - dodatkowy moduł z kamerą w celu oceny treningu.





Our benchmarking platform (FIG. 8) includes, like anatomical model, a flexible abdominal wall made from silicon. It is fixed by special couplings to chassis so that it can be freely configured (move, change the number of layers). However, in contrast to the anatomical model test platform enables research in 3D space, freely scalable (maximum scale 4:1). The frame of the platform and basis allows attachment to any organs model and sensor for testing anywhere. In addition, we can change the workspace by movement of any aluminium profiles in X, Z, Y direction.

The operational area will enable to install some flexible elements to simulate some abdominal organs, and contain measuring sensors. Each element can be easily adapted to the need of the benchmarking testing.

The original solution in our benchmarking platform is the use of so-called multi-storey system allowing the free distribution platform elements in 3D space. This system consists of number (1 to 3) additional flexible planes, stretched at different heights and different widths. These planes can play functionality features in a variety of abdominal organs by attaching various testing components and also, properly formed by cutting (incision) of different shapes and use of measuring sensors may be additional test elements in themselves. In this way, additional 3D planes (contours, the barrier track, horizontal and vertical curtains) make easy modelling of any surgery procedures. 9

Przykład 2: Chirurgia trasluminarna

Anatomiczny model przedstawiony na RYS. 9 został zaprojektowany do symulacji operacji wykonywanej przez naturalne otwory ciała (ang. Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery, NOTES). Przykładem takiej operacji jest chirurgia transoralna wykonywana przez otwory jamy ustnej nosa, gardła, krtani (RYS. 9).

Wśród wielu operacji i zabiegów otolaryngologicznych możemy wyróżnić:

- laryngektomię zabieg laryngologiczny polegający na częściowym lub całkowitym wycięciu krtani. Jest to jedna z metod chirurgicznego leczenia raka krtani i raka gardła dolnego,
- kordektomię usunięcie strun głosowych,
- endoskopową metodę operacyjnego leczenia zapalenia zatok przynosowych.

Model wykonany jest w całości z katalizowanych silikonów Ecoflex 30, który jest prostym w zastosowaniu kauczukiem silikonowym typu addycyjnego. Ecoflex utwardza się w temp. pokojowej przy minimalnym skurczu. Bardzo mała lepkość ułatwia mieszanie i odpowietrzanie. Jest to utwardzony materiał, bardzo miękki, wytrzymały i bardzo elastyczny, zdolny do wielokrotnego rozciągania (do 900%) bez ryzyka rozrywania. Ecoflex zawsze przyjmuje też swoją pierwotną postać. Kauczuki silikonowe EcoFLEX nadają się do różnych zastosowań, w tym tworzenia modeli narządów medycznych i efektów specjalnych zwłaszcza gdzie wymagane jest wielokrotne powtarzanie ruchu.

Manipulator Stiff-Flop

Silikon Ecoflex30 został również użyty do wykonania prototypu manipulatora sterowanego pneumatycznie o zmiennej sztywności. W ramach europejskiego projektu Stiff-Flop tworzone jest miękkie ramię robota, które może przejść przez 12 mm otwór portu (trokara) i w miarę konieczności zmienić swoją sztywność (RYS. 10).



RYS. 9. Anatomiczny model nosa, gardła, krtani do symulacji otolaryngologicznych procedur otolaryngologicznych (Ecoflex 30).

FIG. 9. Anatomical FRK model of nose, throat and larynx for simulate otolaryngology procedures (Ecoflex 30).

Example 2: transoral surgery

Anatomical models presented in FIG. 9, have been specially selected to simulate transoral surgery like model of the nose, throat, larynx.

The main anatomical areas for which model of the nose, throat, larynx may be applied to simulate a wide variety of procedures such as:

- laryngectomy for the removal of the larynx and separation of the airway from the mouth, nose and esophagus. It is one of the methods of surgical treatment of cancer of the larynx,
- cordectomy for the surgical removal of a cord. It usually refers to removal of the vocal cord, often for the purpose of treating laryngeal cancer,
- endoscopic sinus balloon catheterization new device in surgical treatment of rhinosinusitis,
- endoscopic frontal sinusotomy for creating a permanent opening from the frontal sinus into the nose,
- endoscopic sinuplasty an endoscopic technique involving smaller septal incisions and less pain, bleeding, and need for nasal packing.

This model is made completely of platinum-catalyzed silicones Ecoflex 30. Cured material is very soft, very strong and very stretchy, capable of stretching many times its original size without tearing and rebounding to its original form without distortion. Ecoflex silicone rubbers are suitable for a variety of applications including making medical organ models and special effects applications (especially in animatronics where repetitive motion is required).



RYS. 10. (a) Budowa manipulatora Stiff-Flop z włókniny poliestrowej (Dacron) oraz kauczuku silikonowego (Ecoflex30); (b), (c) Test manipulatora wyposażonego w czujnik ciśnienia oraz siły. FIG. 10 (a) The construction of Stiff-Flop with Dacron-Polyester Fiber vessel prosthesis and Ecoflex-30 silicone; (b), (c) Test of manipulator with pressure and force sensors.

10

ш

W chirurgii małoinwazyjnej narzędzia muszą przejść przez wąskie otwory i oddziaływają z miękkimi narządami, dlatego w celu zmniejszenia możliwości niepożądanych urazów muszą się swobodnie poruszać, deformować i zmieniać swoją sztywność. Istnieją ograniczenia dotyczące nowoczesnych zabiegów laparoskopowych chirurgicznych, robotów i systemów wspomaganych z powodu ograniczonego dostępu przez porty trokaru, brak bezpośredniego odczucia dotyku, a także z powodu sztywności narzędzia działającego wewnątrz zamkniętej przestrzeni wypełnionej narządami. Ta zmienna sztywność ramienia robota będzie mieć wiele zastosowań w chirurgii małoinwazyjnej, w tym znajdzie również zastosowanie podczas operacji NOTES przez naturalne otwory w ciele (Natural Orifices Translume-nal Endoscopic Surgery).

Wnioski

Ze względu na niejednorodność materiału biologicznego modelowanie właściwości mechanicznych narządów ludzkich przy pomocy sztucznych materiałów jest bardzo trudne. Wybrane przez nas tworzywa sztuczne obejmują podstawowy zakres właściwości mechanicznych naturalnych organów, które są odwzorowane w symulatorach procedur chirurgicznych. Nasze platformy spełniają warunki symulatorów drugiej generacji, ponieważ odwzorowują zarówno anatomię, zwłaszcza geometrię struktur biorących udział w wyniku interwencji chirurgicznej, jak i obejmują modelowanie własności fizycznych żywych tkanek. Wprowadzenie właściwości biomechanicznych do naszych platform jest niezbędne, aby umożliwić realistyczną interakcję pomiędzy narzędziem chirurgicznym i tkankami miękkimi, w tym deformacji podczas podstawowych operacji manualnych takich jak cięcie lub szycie. Chirurgiczne i sztuczne sceny przedstawionych urządzeń do treningu chirurgii i testowania nowych narzędzi tworzą możliwość standaryzacji procesu kształcenia i badań. Dzięki nim możemy lepiej porównać wykorzystanie różnych narzędzi (mechanicznych, mechatronicznych i robotów RYS. 7, RYS. 8) i skuteczną ocenę postępów w nauce ich stosowania.

Podziękowania

Przedstawione badania zostały wykonane w ramach 7 programu ramowego UE STIFF-FLOP (STIFFness controllable Flexible and Learn-able Manipulator for surgical OPerations - Elastyczny, o kontrolowanej sztywności i uczący się manipulator do operacji).

Autorzy chcieliby również podziękować M. Jakubowskiemu oraz A. Klisowskiemu za wsparcie techniczne w trakcie realizacji tego projektu.

Piśmiennictwo

[1] Sturm L., et al.: Surgical simulation for training: Skillstransfer to the operating room. ASERNIP-S Report No. 61. Adelaide, South Australia: ASERNIP-S, July 2007.

[2] Tsuda S., Scott D.: Surgical skills training and simulation. Curr Probl Surg 46 (2009) 271-370.

[3] Querleu D., Chevallier L., Chapron M., et al.: Complications de la coeliochirurgie gynecologique. J Obstet Gynecol 1 (1993) 57-65.
[4] Cisler J., Martin J.: Logistical Considerations for Endoscopy Simulators. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America 16(3) (2006) 565-575.

[5] Delingette H., Ayache N.: Creating a simulator for training physicians to perform minimally invasive surgica procedures. COMMUNICATIONS OF THE ACM; 48, No. 2 (2005).

[6] Lai E.C., Tang C.N., Li M.K.: Robot-assisted laparoscopic hemihepatectomy: Technique and surgical outcomes. Int Journal Surg 10 (2012) 11-15.

Stiff-Flop manipulator

Ecoflex30 silicone was also used to perform a prototype of pneumatically controlled manipulator with variable stiffness. As part of the European project a soft robotic arm will be created that can squeeze through a standard 12 mm diameter trocar-port, reconfigure itself and stiffen by hydrostatic actuation to perform compliant force control tasks while facing unexpected situations (FIG. 10).

In minimally invasive surgery (MIS), tools go through narrow openings and manipulate soft organs that can move, deform or change stiffness. There are limitations on modern laparoscopic and robot-assisted surgical systems due to restricted access through trocar ports, lack of haptic feedback and difficulties with rigid robot tools operating inside a confined space filled with organs. Also, many control algorithms suffer from stability problems in the presence of unexpected conditions. This variable stiffness robot arm will have many applications in MIS including NOTES (Natural Orifices Translumenal Endoscopic Surgery).

Conclusion

The modelling of mechanical properties of human organs by artificial material is very difficult due to the heterogeneity of the biological material. Artificial materials selected by us cover the basic range of variability of the mechanical properties of the bodies used to simulate the surgical procedures. Our platforms fulfil the conditions of second-generation simulators because they reflect the anatomical environment, in particular the geometry of the organs structures and physical properties of the living tissues during modelling of surgical procedures. The introduction of biomechanical properties to our platforms is essential to allow realistic interactions between surgical instruments and soft tissues, including deformations during basic manual operations like cutting or sewing. The artificial surgical scenes and described devices for surgeons training, create possibility for standardization of the educational and research process. Thanks to them we can better compare the different tools (mechatronic and robotic FIG. 7, FIG. 8) and effectively evaluate the learning progress of their application.

Acknowledgements

....

The study was conducted as part of the STIFF-FLOP (STIFFness controllable Flexible and Learn-able Manipulator for surgical OPerations), the research project of the UE Seventh Framework Programme.

The authors would also like to express their gratitude to *M*. Jakubowski and A. Klisowski for their technical support during the project.

References

[7] Schneider C.M., Peng P.D., et al.: Robot-assisted laparoscopic ultrasonography for hepatic surgery. Surgery 151(5) (2012) 756-762.
[8] Giulianotti P.C., Coratti A. Sbrana F., Addeo P., Bianco F.M., Buchs N.C., Annechiarico M., Benedetti E.: Robotic liver surgery: Results for 70 resections. Surgery 149(1) (2011) 29-39.
[9] Luca F., Cenciarelli S., Valvo M., Pozzi S., Faso F.L., et al.: Full Ro-

[9] Luca P., Centralein S., Valvo M., POZJ S., Paso P.L., et al., Pull Robotic Left Colon and Rectal Cancer Resection: Technique and Early Outcome. Annals of Surgical Oncology 16(5) (2009) 1274-1278.
[10] Delingette H., Ayache N.: Hepatic surgery simulation. COMMUNICATIONS OF THE ACM February 2005/Vol. 48, No. 2.

[11] Drasin T., Dutson E., Gracia C.: Use of a robotic system as surgical first assistant in advanced laparoscopic surgery. J Am Coll Surg. 199(3) (2004) 368-373.

[12] Dolghi O., Strabala K.W., Wortman T.D., Goede M.R., Farritor S.M., Oleynikov D.: Miniature in vivo robot for laparoendoscopic single-site surgery. Surg Endosc. 25(10) (2011) 3453-3458.

12 ••••• WSTĘPNA OCENA WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNO-ELEKTRYCZNYCH W ZAKRESIE NISKICH CZĘSTOTLI--WOŚCI BIOMATERIAŁOWEGO MODELU DOŚWIADCZALNEGO KOŚCI DŁUGICH W STANIE PATOLOGICZNYM

Ryszard Uklejewski^{1,2*}, Tomasz Czapski¹, Mariusz Winiecki^{1,2}

¹ Zakład Podstaw Bioinżynierii Medycznej, Instytut Techniki, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, ul. Karola Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz
² Zespół Inżynierii Bioprocesów i Biomateriałów Medycznych, Zakład Inżynierii Procesowej, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Poznańska, pl. Marii Skłodowskiej-Curie 2, 60-965 Poznań
* E-mail: uklejew@ukw.edu.pl

Streszczenie

Przedstawiono wyniki doświadczalnych badań porównawczych dotyczących metod wytworzenia biomateriałowego modelu kości długich w stanie patologicznym, tj. nie w pełni zmineralizowanych (stan osteomalacji) oraz o obniżonym kościotworzeniu (stan osteoporotyczny), otrzymanego na bazie wołowych kości udowych, z wykorzystaniem stosowanych w inżynierii biomateriałów metod częściowego odbiałczania i częściowego odwapniania. Ten biomateriałowy model kości długich jest niezbędny do prowadzenia doświadczalnych badań właściwości strukturalno--elektrycznych kości długich w celu zbudowania prototypowego systemu pomiarowo-obliczeniowego do wyznaczania gęstości i parametrów porosprężystych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych oryginalną nieinwazyjną metodą elektroosteodensytometrii (zgłoszenie patentowe krajowe i międzynarodowe). Proces odbiałczania prowadzono porównawczo z użyciem roztworów NaOCI, H2O2, KOH i NaOH, natomiast proces odwapniania próbek kości wołowych prowadzono porównawczo z użyciem roztworów HNO₃, HCI i EDTA oraz w mieszaninie roztworów HNO₃ i HCHO. Zbadano kinetykę przeprowadzonych procesów, monitorując stężenia białka oraz wapnia w zastosowanych roztworach w funkcii czasu. Na podstawie zbadanych przebiegów procesów możemy obecnie zarekomendować do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym: o obniżonym kościotworzeniu – odbiałczanie z użyciem 7% roztworu nadtlenku wodoru (H₂O₂), a dla nie w pełni zmineralizowanych – odwapnianie z użyciem 0,5 M roztworu kwasu solnego (HCl). Przedstawiono pilotażowe wyniki doświadczalnej analizy właściwości strukturalno-elektrycznych biomateriałowego modelu kości długiej w stanie obniżonego kościotworzenia (badano trzy częściowo odbiałczone kości udowe wołowe) z wypełnieniem porów modelu wieloelektrolitowym płynem fizjologicznym Ringera, w zakresie niskich częstotliwości (od 20 Hz do 10 kHz) i w zależności od lokalizacji badanej próbki wzdłuż trzonu kości długiej. Stwierdzono, że: 1) wartości modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ [Ω /cm] trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej maleją bardzo wyraźnie w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do 500 Hz;

PRELIMINARY STUDY OF STRUCTURAL-ELECTRICAL PROPERTIES IN THE LOW FREQUENCY RANGE OF EXPERIMENTAL BIOMATERIAL MODELS OF LONG BONES IN A PATHOLOGICAL STATE

Ryszard Uklejewski^{1,2*}, Tomasz Czapski¹, Mariusz Winiecki^{1,2}

¹ DEPARTMENT OF MEDICAL BIOENGINEERING FUNDAMENTALS, INSTITUTE OF TECHNOLOGY, CASIMIR THE GREAT UNIVERSITY, KAROLA CHODKIEWICZA 30, 85-064 BYDGOSZCZ, POLAND ² LABORATORY OF MEDICAL BIOMATERIALS AND BIOPROCESS ENGINEERING, DEPARTMENT OF PROCESS ENGINEERING, INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND CHEMICAL ENGINEERING, POZNAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MARII SKLODOWSKIEJ-CURIE 2, 60-965 POZNAN, POLAND, * E-MAIL: UKLEJEW@UKW.EDU.PL

Abstract

We present the results of a comparative experimental study on methods considered for the manufacture of a biomaterial model of long bones in a pathological state, i.e. insufficiently mineralized bone (osteomalacia) and reduced osteogenesis (osteoporosis). obtained from bovine femoral bone, using methods applied in the engineering of biomaterials such as partial deproteinization and partial demineralization. The biomaterial model is required for experimental research into the structural-electrical properties of long bones, which will be carried out to build a prototype for a measurement system for the evaluation of bone densitometry and poroelastic properties with the use of an original and non-invasive method of electroosseodensitometry (Polish and international patent applications). The kinetics of chemical bone deproteinization processes in NaOCI, H₂O₂, KOH and NaOH solutions and chemical bone demineralization processes in HNO₃, HCI, EDTA solutions and in a mixture of HNO₃ and HCHO were comparatively studied and the protein and calcium contents were monitored as a function of time. On the basis of the functional graphs obtained from the observed processes, we can currently recommend the following conditions for manufacturing a biomaterial model of long bones in a pathological state: deproteinization using a 7% solution of hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce a model of bone in a state of reduced osteogenesis and decalcification with 0.5 M hydrochloric acid (HCI) to produce a model of insufficiently mineralized bone. The results of a pilot experimental analysis of the structural-electrical properties of the biomaterial model of long bones are presented for a state of reduced bone formation (osteoporotic; three partially deproteinized bovine femurs were examined). The bone pores of the model were filled with physiological multielectrolyte Ringer's saline and assessed in a low frequency range (20 Hz to 10 kHz) as a function of the location of bone shaft samples along the diaphysis. It was found that: 1) values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω /cm] of the bone shaft of the model osteoporotic long bone decreased very clearly as a function of frequency in the range from 20 Hz to ca. 500 kHz;

od częstotliwości 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości |Z1 są niewielkie, a powyżej częstotliwości 2 kHz wartość modułu impedancji jednostkowej |Z₁| praktycznie nie zależy od zmian częstotliwości; 2) średnia wartość modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej okazała się względnie stała wzdłuż długości trzonu kości i wynosiła ok. 670 Ω/cm dla częstotliwości 100 Hz oraz ok. 630 Ω/cm dla częstotliwości 10 kHz. Otrzymane pilotażowe wyniki pomiarów parametrów elektrycznych określających właściwości strukturalno-elektryczne kości długich osteoporotycznych wymagają potwierdzenia na większej liczbie próbek trzonowo-kostnych częściowo odbiałczanych; planujemy też poszerzenie analizy doświadczalnej właściwości strukturalno--elektrycznych kości długich o obniżonej mineralizacji (częściowo odwapnionych).

Słowa kluczowe: właściwości elektryczne kości długich, osteoporoza, osteomalacja, biomateriałowy model doświadczalny kości, odbiałczanie kości, odwapnianie kości

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 12-22]

Wprowadzenie

Kość jako tkanka zmineralizowana stanowi jeden z naturalnych biomateriałów kompozytowych, składający się z macierzy organicznej (ok. 90% to kolagen typu I) i nieorganicznego fosforanowo-wapniowego minerału kostnego (hydroksyapatyt, HA). Fundamentalnym procesem fizjologicznym zachodzącym w porosprężystych kościach jest zjawisko elektrokinetycznego przepływu jonowego płynu śródkostnego w przestrzeni porowej, wywołane mechanicznym obciążaniem kości (load induced bone fluid flow) podczas codziennej aktywności fizycznej organizmu i związane z tym przepływem generowanie elektrycznych osteopotencjałów, które stymulują komórki tkanki kostnej (poprzez tzw. voltage-gated calcium Ca2+ channels obecne w błonach komórkowych komórek kostnych [1]) do odpowiedzi biologicznej prowadzącej do procesów regeneracji i przebudowy kości [2]. Badaniem biernych właściwości elektrycznych kości korowej i kości gąbczastej zajmowało się wielu autorów [3-13]. Brak jednak, jak dotąd, badań doświadczalnych właściwości elektrycznych całych elementów kostnych układu kostno-stawowego ludzkiego, jak i zwierząt doświadczalnych. Praca stanowi kontynuację wcześniejszych prac teoretycznych [14-19] i pierwszy etap zaplanowanych prac doświadczalnych, dotyczących opracowanej metody nieinwazyjnego określania gęstości i parametrów porosprężystych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych, będącej przedmiotem zgłoszenia patentowego w UP RP i Euro-PCT [20,21].

Celem tej pracy jest wytworzenie biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym i przeprowadzenie wstępnej oceny właściwości elektrycznych próbek modelowej kości długiej, które są funkcją biostruktury i składu chemicznego kości. Łączymy w jednej pracy wytworzenie biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym i przeprowadzenie wstępnych badań właściwości elektrycznych próbek trzonowo-kostnych modelowej kości długiej w stanie patologicznym, gdyż opracowana przez nas metoda wyznaczania parametrów strukturalno-mechanicznych (zależnych od zawartości białka oraz od zawartości wapnia w kości) kości długich w stanie patologicznym bazuje na pomiarze właściwości elektrycznych kości długiej. from a frequency of 500 Hz to 2 kHz, the changes in the $|Z_1|$ value were small, and above 2 kHz, the $|Z_1|$ value practically did not depend on frequency changes. 2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance |Z₁| of the bone shaft of the model osteoporotic long bone was found to be relatively constant along the length of the bone shaft and was about 670 Ω /cm for a frequency of 100 Hz and about 630 Ω /cm for a frequency of 10 kHz. The results of the preliminary study on the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state require confirmation in a full experimental study on a larger number of model osteoporotic long bones; we are also planning to extend the experimental analysis to the structural-electrical properties of long bones with impaired mineralization (partially decalcified).

Keywords: electrical properties of long bones, osteoporosis, osteomalacia, experimental biomaterial model of long bones, deproteinization, decalcification

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 12-22]

Introduction

Bone, as a mineralized tissue, is a composite biomaterial built of an organic matrix (ca. 90% composed of type I collagen) and inorganic calcium phosphate bone mineral (hydroxyapatite, HA). The fundamental physiological process occurring in poroelastic bones is the electrokinetic phenomenon of intraosseous ionic fluid flow induced by mechanical bone loading (i.e. load induced bone fluid flow) arising from daily physiological activity in a living organism. This intraosseous ionic fluid flow generates electrical potentials in the bone, which can stimulate - via voltagegated calcium Ca²⁺ channels in bone cell membranes [1] - the biological response of regeneration and remodeling in bone cells [2]. The passive electrical properties of cortical bone and cancellous bone have been investigated by several authors [3-13]. However, to date, there has been no experimental research on the electrical properties of whole bone elements of the human skeleton or of an experimental animal skeleton. This paper is a continuation of our earlier theoretical works [14-19] and the first stage of planned experimental research regarding the development of a noninvasive method to determine the density and poroelastic properties of normal and pathological long bones, which is the subject of our patent applications to Euro-PCT [20,21].

The major goal of this study was to produce an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state and a preliminary evaluation of the electrical properties of samples of this long bone model which are a function of the biostructure and chemical composition of bone. We combine in one paper the production of the experimental biomaterial model of long bones in a pathological state and preliminary studies on the electrical properties of bone shaft samples of the biomaterial model of long bones in a pathological state. The method developed by us for the determination of the structural-mechanical parameters of long bones in a pathological state (depending on the protein content and the calcium content of the bone) is based on the measurement of the electrical properties of long bone.

WYTWORZENIE BIOMATERIAŁOWEGO MODELU KOŚCI W STANIE PATOLOGICZNYM – DOŚWIADCZALNA ANALIZA PORÓWNAWCZA KINETYKI PROCESÓW PREPARATYKI KOŚCI

Głównym celem prowadzonych badań dotyczących zaprojektowania i wytworzenia odpowiednich biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym, tj. nie w pełni zmineralizowanych (stan osteomalacji) oraz o obniżonym kościotworzeniu (stan osteoporotyczny), jest porównawcza analiza przebiegu różnych procesów odbiałczania [22-26] oraz odwapniania [23,24,27-33] wołowej kości korowej trzonów kości długich, pod kątem możliwości zaprojektowania i wytworzenia takich biomateriałowych modeli doświadczalnych.

Materiały i metody

Badania kinetyki ośmiu możliwych procesów chemicznej preparatyki kości, w tym czterech procesów odbiałczania oraz czterech procesów odwapniania, prowadzono na próbkach wołowej kości korowej pobranych z trzonów ośmiu kości udowych; wykorzystano kości wołowe pozyskane z lokalnej ubojni. Kości udowe pozbawiono obu nasad, a trzony oczyszczono mechanicznie z tkanek miękkich, okostnej i śródkostnej, szpiku kostnego, a następnie precyzyjnie pocięto na pierścienie kostne o wysokości 5 mm. Dalej pierścienie kostne podzielono używając ręcznej piły na segmenty kostne, z których precyzyjnie wycięto sześcienne próbki o wymiarach 5 mm × 5 mm × 5 mm. Precyzyjne cięcie kości na pierścienie kostne oraz cięcie segmentów kostnych na sześcienne próbki kostne zrealizowano w warunkach ciągłego chłodzenia wodą na precyzyjnej przecinarce wyposażonej w tarczę diamentową (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany). Przygotowano 400 sześciennych próbek kości korowej, po 50 sztuk na każdy z badanych procesów chemicznej preparatyki. Kości oraz próbki kostne na wszystkich etapach przygotowania były przechowywane w 0,9% roztworze chlorku sodu (NaCI) w temperaturze 4°C.

Przed procesem odbiałczania próbki kości korowej z trzonów kości długich zostały odwodnione w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu (70%, 95%, 99,8% etanolu; dwie zmiany roztworu na każde stężenie, roztwory zmieniano co 24 h), oraz odtłuszczone w acetonie w kąpieli o stężeniach 90% i 99,8%, po dwie zmiany roztworu na każde stężenie (roztwory zmieniano co 24 h). Następnie próbki kostne zostały osuszone w laboratoryjnej suszarce komorowej SML 42/250/M (Zelmed, Polska) w temperaturze 60°C przez 24 h.

Grupy po 50 próbek kości korowej z trzonów kości długich odbiałczano w temperaturze 37°C przez 14 dni z codzienną wymianą roztworów, zanurzając każdą z grup próbek odpowiednio w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCI), 7% roztworze nadtlenku wodoru (H_2O_2), 1N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH). W trakcie procesu odbiałczania próbki kostne każdej z grup były umieszczone w 10 naczyniach z roztworem odbiałczającym (po 5 próbek w każdym z naczyń) i poddane wytrząsaniu na wytrząsarce wielozadaniowej ORBIT 1000 (Labnet, USA) w celu uzyskania optymalnej kinetyki procesu.

Prowadzono okresową kontrolę przebiegu procesu odbiałczania próbek kostnych (w 1, 2, 3, 5, 7 i 14 dniu) i określono końcowy punkt odbiałczania stosując metodę Lowry'ego [34]. W tym celu, przed rozpoczęciem procesu, jak również w trakcie jego trwania pobierano z każdego z odbiałczających roztworów próbki kontrolne. Zawartość białka w tych próbkach określano za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-2401 UV-VIS (Shimadzu Corporation, Japonia).

MANUFACTURING THE BIOMATERIAL MODEL OF PATHOLOGICAL BONE – COMPARATIVE STUDY OF THE KINETICS OF VARIOUS RESPECTIVE BONE PREPARATION PROCESSES

The major goal of this comparative study was to investigate the process progress of various deproteinization [22-26] and decalcification [23,24,27-33] procedures using bovine cortical bone and to evaluate the effectiveness regarding the design and manufacturing of suitable experimental models of long bones in a pathological state, i.e. insufficiently mineralized bone (osteomalacia) and reduced osteogenesis (osteoporosis).

Materials and methods

The kinetics of eight bone chemical treatment processes were comparatively studied using bovine cortical bone specimens taken from eight femur shafts, including four bone deproteinization processes and four bone decalcification processes; femoral bones were purchased from a local slaughterhouse. Both epiphyses of the femoral bones were first cut off and the bone shafts were mechanically cleaned of all soft tissues, periosteum, endosteum and bone marrow. Afterwards, the bone shafts were precisely cut into 5 mm thick bone rings. Then, from every ring, bone segments were cut using a hacksaw and the segments were precisely machined into cubes (5 mm × 5 mm × 5 mm). The precise cutting of bone shafts into rings and afterward into cubes was performed using a rotating diamond wheel saw (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) under constant water irrigation. A total number of 400 cortical bovine femur cubic specimens were prepared, i.e. 50 for each chemical treatment process investigated. Bones and fresh bone specimens after cutting were stored in 0.9 wt% sodium chloride (NaCl) at 4°C.

Before deproteinization, fresh cortical bone specimens from the femoral shaft were dehydrated in a series of alcohol baths (70 wt%, 95 wt%, 99.8 wt% ethanol, with two changes for each concentration and with the solvent refreshed daily), and degreased in a series of acetone baths (90 wt% and 99.8 wt%, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily). After that, the cortical bone specimens were dried in a laboratory chamber dryer SML 42/250/M (Zalmed, Poland) at 60°C overnight.

The chemical deproteinization processes were accomplished in packets of 50 specimens of femoral shaft cortical bone within 14 days at 37°C (the temperature was kept constant using a water bath) with the solvents refreshed daily. Each packet of bone specimens was immersed in: 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI), 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), 1N potassium hydroxide (KOH) or 1N sodium hydroxide (NaOH). The process protocols were carried out in 10 vessels (not more than five specimens per vessel) that were constantly mixed using OrbitTM 300 Multipurpose Digital Vortexer (Labnet, USA).

The periodical evaluation of the course of all deproteinization processes was performed (after day 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 14 of the process) and the completion of deproteinization was verified using protein analysis according to Lowry's method [34]. For this purpose, directly before beginning the deproteinization process, as well as during the process, the control bone specimens were taken from each deproteinizing agent. The protein content in control specimens was measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2401 UV-VIS, Shimadzu Corporation, Japan).

14

Przed procesem odwapniania próbki kości wołowej korowej zostały odtłuszczone w acetonie w kąpieli o stężeniach 90% i 99,8%, po dwie zmiany roztworu na każde stężenie (roztwory zmieniano co 24 h). Po procesie odwapniania próbki kostne zostały odwodnione w szeregu alkoholi (etanol) o rosnącym stężeniu (70%, 95%, 99,8%; po dwie zmiany roztworu na każde stężenie, roztwory zmieniano co 24 h).

Grupy po 50 próbek kości korowej z trzonów kości długich odwapniano w temperaturze pokojowej zanurzając każdą z grup próbek odpowiednio w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI) oraz 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) (roztwory zmieniano co dwie godziny), a także 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów: 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% formaldehydu (HCHO); roztwory zmieniano co 24 h. W trakcie procesu odwapniania próbki każdej z grup były umieszczone w 10 naczyniach z roztworem odwapniającym (po 5 próbek w każdym z naczyń) i poddane wytrząsaniu na wytrząsarce wielozadaniowej ORBIT 1000 (Labnet, USA) w celu wytworzenia warunków dla uzyskania optymalnej kinetyki procesu.

Prowadzono okresową kontrolę przebiegu procesów odwapniania z zastosowaniem ilościowej analizy chemicznej, oznaczając kompleksometrycznie wapń znajdujący się w roztworze odwapniającym za pomocą roztworu mianowanego EDTA w obecności wodorotlenku sodowego (NaOH) i mureksydu ($C_8H_5N_5O_6\cdot NH_3$), pełniącego rolę wskaźnika. Końcowy punkt procesu odwapniania określono stosując test chemiczny polegający na neutralizacji ostatnich wymian roztworu odwapniającego wodorotlenkiem amonu (NH_4OH) i dodaniu szczawianu amonu ($C_2H_0N_2O$) [33,35]. Brak osadu w próbce roztworu odwapniającego oznaczał, że nie ma w nim jonów wapnia.

Wyniki i dyskusja

RYS. 1 przedstawia krzywe spadku zawartości białka w próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych poddanych odbiałczaniu w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCI), 7% roztworze nadtlenku wodoru (H_2O_2), 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH). Na wykresie na RYS. 2 zaprezentowano krzywe spadku zawartości wapnia w próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych poddanych odbiałczaniu w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI), 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃), 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% roztworu formaldehydu (HCHO).

Procesy chemicznego odbiałczania próbek kości korowej z trzonów kości długich wołowych prowadzone w 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz w 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH) przerwano po 7 dniach, ponieważ próbki kostne zaczęły stawać się miękkie i następnie zaczęły rozpuszczać się. Zawartość białka w próbkach po 7 dniu odbiałczania w tych roztworach określona została na poziomie 35% i 39% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów KOH i dla NaOH. Proces kontynuowano do 14 dnia dla pojedynczych (najlepiej zachowanych) próbek kostnych, określając w nich końcową zawartość białka na poziomie 18% i 22% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów NaOH i KOH. Zawartość białka w próbkach odbiałczanych w 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCI) i w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂) po 7 dniu prowadzenia procesu określono na poziomie 12% i 13% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów NaOCI i H₂O₂.

Before decalcification, the fresh femoral shaft cortical bone specimens were degreased in a series of acetone baths (90 wt% and 99.8 wt%, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily). After decalcification, the cortical bone specimens were dehydrated in a series of alcohol baths (70 wt%, 95 wt%, 100 wt% ethanol, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily).

The chemical decalcification processes were accomplished in packets of 50 specimens of femoral shaft cortical bone at room temperature. Each packet of bone specimens was immersed in: 0.5 M hydrochloric acid (HCl) or 10 wt% nitric acid (HNO₃), with the solvents refreshed every two hours, and in: 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO), with the solvents refreshed daily. The process protocols were carried out in 10 vessels (not more than five specimens per vessel) that were constantly mixed using OrbitTM 300 Multipurpose Digital Vortexer (Labnet, USA).

The periodical evaluation of the course of all decalcification processes was performed by determining the calcium concentration in the solvents by complexometric titration of the demineralization compound solution using a standard volumetric EDTA solution in the presence of sodium hydroxide (NaOH) and murexide ($C_8H_5N_5O_6\cdot NH_3$) as indicators. The end-point of decalcification was determined with the ammonium oxalate test: the 5 ml samples of the final changes of decalcifiers were neutralized by adding drops of ammonium hydroxide (NH₄OH) and when the solutions turned litmus blue (pH above 7), the 5 ml of saturated aqueous solution of ammonium oxalate (C2H0N2O about 3%; stable stock solution) was added [33,35] to precipitate the Ca2+ from each of the decalcifying fluid. When no more Caoxalate precipitate was seen in the most recent change of decalcifying fluid, then the decalcification was completed.

Results and Discussion

FIG. 1 presents the curves of the kinetics of the protein content decrease in bovine femoral shaft cortical bone specimens during the deproteinization processes using 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI), 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide (NaOH). FIG. 2 shows the calcium content decrease in the solvents during the decalcification processes using 0.5 M hydrochloric acid (HCI), 10 wt% nitric acid (HNO₃), 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO).

The processes of chemical deproteinization of bovine cortical bone specimens in 1N potassium hydroxide (KOH) solution and in 1N sodium hydroxide (NaOH) solution were completed after 7 days, because majority of the specimens had started to soften and dissolve. According to Lowry's method, the protein concentration in these bone specimens were at circa 42% and 45% of protein content at the beginning of the deproteinization process for KOH and NaOH, respectively. For several isolated (well preserved) specimens, the processes were continued until day 14 and the protein concentration assessed at this point was 18% and 22% of the protein content at the beginning of the deproteinization process, for NaOH and KOH, respectively. The protein concentration in bone specimens deproteinized with 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI) and in 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂) after day 7 were at 12% and 13% of the protein content at the beginning of the deproteinization process, for NaOCI and H₂O₂, respectively.



RYS. 1. Charakterystyki spadku zawartości białka w funkcji czasu w odbiałczanych chemicznie próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCI), 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂), 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH). FIG. 1. Diagram presenting the observed decrease in protein content at various time intervals during the process of chemical deproteinization of bovine femoral shaft cortical bone specimens, with the use of the following solutions: 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI), 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide (NaOH).

Nie zaobserwowano istotnych zmian po 7 dniu prowadzenia procesu w 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), ponieważ stężenie białka w próbkach kości korowej po kolejnych 7 dniach procesu zmniejszyło się jedynie o 3%. Zaobserwowano największą szybkość przebiegu procesu odbiałczania w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H_2O_2), dla którego zawartość białka w próbkach kości korowej po 48 h trwania procesu spadła do 40% w odniesieniu do początkowej zawartości białka. Zawartość białka w próbkach odbiałczanych w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H_2O_2) po 14 dniach wynosiła 5% w odniesieniu do początkowej zawartości białka.

Procesy chemicznego odwapniania prowadzone w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl) oraz 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃), oba zakończone po 48 h, przebiegały wyraźnie szybciej w porównaniu do procesów prowadzonych w 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz w mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% formaldehydu (HCHO), które zakończyły się odpowiednio po 5 i 14 dniach. W przypadku roztworu ETDA pierwsze efekty prowadzonego procesu odwapniania można było zaobserwować dopiero po 48 h. W początkowej fazie trwania procesów odwapniania prowadzonych w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) oraz 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI), ich szybkości były podobne, ale po 24 h proces prowadzony w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) wyraźnie wyhamował w stosunku do procesu prowadzonego w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI), dla którego intensywność odwapniania próbek kostnych była praktycznie stała przez cały analizowany czas. Skuteczność procesów odwapniania w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI) oraz w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO3) jest zbliżona, ponieważ w obu przypadkach po ok. 48 h prowadzenia procesu doszło do praktycznie całkowitego odwapnienia próbek.



RYS. 2. Charakterystyki spadku zawartości wapnia w funkcji czasu w odwapnianych chemicznie próbek kości korowej z trzonów kości długich wołowych w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI), 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃), 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% roztworu formaldehydu (HCHO).

FIG. 2. Diagram of the calcium content decrease in solvents during the decalcification process using: 0.5 M hydrochloric acid (HCI), 10 wt% nitric acid (HNO₃), 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO).

The continuation of the deproteinization process carried out in 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI) led to insignificant changes after day 7, because after another 7 days of the process, the protein concentration in the bone specimens had decreased by only 3%. A high rate of the deproteinization process was observed in the case of 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), for which the protein contents after first 48 h decreased up to 40% of the protein content at the beginning of the deproteinization process. After day 14 of the process carried out in 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), the protein content in specimens was about 5% of the protein content at the beginning of the deproteinization process.

The processes of chemical decalcification in 0.5 M hydrochloric acid (HCl), 10 wt% nitric acid (HNO₃), both completed after 48 h, had higher rates in comparison to the processes of chemical decalcification in 0.5 M disodium versenate (EDTA) and in a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO), which were completed after 5 and 14 days, respectively. In the case of the decalcification process in 0.5 M disodium versenate (EDTA), the first effects of the process were observed only after 48 h. In the initial phase of the decalcification process in 10 wt% nitric acid (HNO₃) and in 0.5 M hydrochloric acid (HCl), the rates were similar, but after 24 h, the process carried out in 10 wt% nitric acid (HNO₃) was significantly slowed down in comparison to the decalcification process carried out in 0.5 M hydrochloric acid (HCI), for which the intensity of decalcification was practically constant. The efficiency of the decalcification processes in 0.5 M hydrochloric acid (HCI) and 10 wt% nitric acid (HNO₃) was similar, because complete decalcification was attained in both cases after 48 h of the process.

Podsumowanie części badawczej l

Najlepszy efekt procesu odbiałczania próbek kości korowej z trzonów kości długich wołowych uzyskano dla procesu prowadzonego w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂), dla którego proces ten przebiegał najbardziej intensywnie - 60% białka usunięto po 48 h prowadzenia procesu oraz najbardziej skutecznie - po 14 dniach z próbek kości korowej usunięte zostało do 95% białka macierzy kostnej (głównie kolagenu). Proces odbiałczania w 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCI), charakteryzował się mniejszą szybkością, ale po 7 dniach, jak wynika z otrzymanych charakterystyk kinetyki procesów zaprezentowanych na RYS. 1, dla obu tych roztworów uzyskano zbliżony poziom odbiałczenia, określony procentowym spadkiem zawartości białka w próbkach kontrolnych w odniesieniu do początkowej jego zawartości. Ze względu na zaobserwowane od ok. 6 dnia trwania procesu mięknienie próbek kostnych zanurzonych w 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz w 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH), a także wyraźnie mniejszą predkość przebiegu procesu i istotnie mniejszą skuteczność, odbiałczanie w tych roztworach uznano za nieefektywne.

Najlepszy efekt odwapnienia próbek kości wołowej uzyskano dla procesu prowadzonego w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCI). W tym przypadku praktycznie stała szybkość procesu odwapniania próbek kostnych ułatwia zaprojektowanie biomateriałowego modelu kości w stanie patologicznym o założonym stopniu częściowego odwapnienia. Procesy odwapniania w 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50 10% roztworu HNO₃ i 40% roztworu formaldehydu (HCHO), ze względu na dużo mniejszą szybkość procesu nie były rekomendowane do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym.

PILOTAŻOWE BADANIA DOŚWIADCZALNE NISKOCZĘSTOTLIWOŚCIOWYCH WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNO-ELEKTRYCZNYCH BIOMATERIAŁOWEGO MODELU KOŚCI DŁUGICH W STANIE PATOLOGICZNYM

Materiały i metody

Do pilotażowych badań właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym (kość osteoporotyczna) zastosowano biomateriałowy model doświadczalny kości długich częściowo odbiałczonych (ok. 10% odbiałczenia), wytworzony z zastosowaniem procesu wytypowanego na podstawie przedstawionej w rozdziale 2 analizy porównawczej kinetyki przeprowadzonych procesów odbiałczania kości. Po odcięciu nasad bliższej i dalszej, (RYS. 3), z części środkowej wołowej kości udowej z zastosowaniem precyzyjnej przecinarki wyposażonej w tarczę diamentową (IsoMet[™] 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) wycięto próbki trzonowo-kostne w postaci pierścieni o wysokości 10 mm.

Concluding remarks from the research part I

The best deproteinization effect in cortical bone specimens taken from bovine femur shafts was observed for the deproteinization process in 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), for which the highest rate of the process was observed -60% of bone proteins were removed in the first 48 h of the process; this process was also the most efficient - 95% of bone proteins were removed from bovine cortical bone specimens. The deproteinization process in 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCI) had a slower rate in comparison to the deproteinization process in 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), but as it can be read from the diagram of the deproteinization kinetics shown in FIG. 1, for both processes, the same level of deproteinization was observed, as characterized by the percentage protein decrease referring to the protein content at the beginning of the deproteinization process. Because of the softening and dissolving of most bone specimens deproteinized in 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide (NaOH), as well as the distinctly lower rate of the process and considerably reduced efficiency, the deproteinization processes in these agents we judged as ineffective.

The best decalcification effect in cortical bone specimens was observed for the process carried out in 0.5 M hydrochloric acid (HCl). In this case, the practically constant rate of the process facilitates the design of a biomaterial model of the pathological bone to the desired level of partial decalcification. Because of the significantly lower rate, the processes of decalcification in 0.5 M disodium versenate (EDTA) and in the 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO) are not recommended for the manufacture of a biomaterial model of pathological bone.

PRELIMINARY STUDY ON THE LOW-FREQUENCY STRUCTURAL-ELECTRICAL PROPERTIES OF BIOMATERIAL EXPERIMENTAL MODEL OF LONG BONES IN A PATHOLOGICAL STATE

Material and methods

For the preliminary studies of the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic bone) state, the biomaterial experimental model of partially deproteinized bone (ca. 10% deproteinization) was used, manufactured using the deproteinization process found to be the most effective in the comparative study presented above on the kinetics of various bone deproteinization processes. After cutting off the proximal and distal epiphyses (FIG. 3), 10 mm bone rings were cut out from the bone shaft using a rotating diamond wheel saw (IsoMet[™] 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) under constant water irrigation.



RYS. 3. Schemat sposobu cięcia badanej kości długiej i numeracji ciętych próbek trzonowo-kostnych. FIG. 3. A scheme of the manner of cutting the tested long bone and numbering of the bone shaft samples. 17

Próbki trzonowo-kostne zostały zanurzone w wieloelektrolitowym płynie fizjologicznym Ringera i przechowywane do następnego dnia w chłodziarce w temperaturze 4°C. Bezpośrednio przed pomiarem z każdej próbki został usunięty powierzchniowy nadmiar płynu fizjologicznego. Czas trwania pomiaru wartości parametrów elektrycznych dla poszczególnych próbek określano na podstawie osiągnięcia przez układ pomiarowy stanu ustalonego.

Pomiary wartości wybranych parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych wykonano metodą dwuelektrodową z zastosowaniem precyzyjnego miernika RLC-821 (G[™]INSTEK, UK), który umożliwił pomiar wartości impedancji elektrycznej w zakresie częstotliwości: od 20 Hz do 10 kHz z błędem ±0.03% oraz w zależności od położenia (lokalizacji) badanej próbki wzdłuż modelowego trzonu kostnego. Zmierzono wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| próbek trzonowo-kostnych oraz wyznaczono wartości modułu impedancji elektrycznej kości długiej na jednostkę długości |Z1|, reaktancji na jednostkę długości X1 oraz rezystancji na jednostkę długości R1. Schemat stanowiska pomiarowego zbudowanego do wyznaczania wartości parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowgo modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym przedstawiono na RYS. 4. Elektrody pomiarowe o średnicy 30 mm i 40 mm wykonane ze stali nierdzewnej (AISI 316L) zamocowano na izolowanym elemencie mocująco-obciążającym (RYS. 4), umożliwiającym dostosowanie odległości między elektrodami do rozmiarów badanych próbek trzonowo-kostnych, i zastosowano odpowiedni mechaniczny docisk (do ok. 20 N) elektrod do powierzchni próbek. W celu poprawy kontaktu pomiędzy elektrodą a badaną próbką trzonowo-kostną zastosowano pastę przewodzącą Ten20 Conductive (Weaver and Company, USA).



Then, the long bone shaft specimens in the shape of bone rings were immersed in multi-electrolyte Ringer's solution and stored until the next day at 4°C. Shortly before the measurement of the electrical properties, the excess physiological saline was removed from the surface of each bone specimen. The duration of the measurement of electrical parameters in individual samples was determined on the basis of the time required for the measurement system to reach a steady state.

The measurements of the chosen electrical parameters of the bone shaft specimens from the biomaterial model of osteoporotic long bone were performed by the doubleelectrode method using a precision RLC-821 meter (G[™]IN-STEK, UK) that allowed electrical impedance values to be measured in the frequency range from 20 Hz to 10 kHz with an error of 0.03%, and depending on the position (location) of the sample along the model bone shaft. The values of the electrical impedance modulus |Z| of long bone shaft rings were measured, and the values of the electrical impedance modulus of long bone per unit length |Z₁|, the reactance per unit length X_1 and the resistance per unit length R_1 were determined. A scheme of the measurement system built for the determination of the electrical parameters of bone shaft specimens from an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state is presented in FIG. 4. Measuring electrodes with a diameter of 30 mm and 40 mm made of stainless steel (AISI 316L) were mounted on an isolated fixing-loading element (FIG. 4), which allows for the adjustment of the distance between the electrodes according to the size of the tested long bone shaft samples. Moreover, the appropriate mechanical load (up to 20 N) of the electrodes on the surface of the samples was applied. In order to improve the contact between electrodes and the tested long bone shaft samples, the TEN20 Conductive paste (Weaver and Company, USA) was used.

> RYS. 4. Schemat stanowiska pomiarowego do wyznaczania wartości parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym. FIG. 4. The scheme of the measurement system for the determination of the electrical parameters of bone shaft specimens of an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state.

Wyniki i dyskusja

Przykładowe wyniki przeprowadzonych pomiarów wartości modułu impedancji elektrycznej |Ζ| [Ω] niektórych pierścieniowych próbek trzonowo-kostnych, pochodzących ze środkowej części biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (ok. 10% odbiałczona kość) po odcięciu obu części nasadowych, w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do10 kHz, przedstawiono na RYS. 5. Numeracja próbek trzonowo-kostnych odpowiada ich lokalizacji określonej kolejno względem początku środkowej części (tj. względem krańcowego przekroju poprzecznego odciętej nasady bliższej) badanego modelu doświadczalnego kości długiej.

Results and discussion

The results of the measurements of the electrical impedance modulus $|Z| [\Omega]$ values of the ring-form bone shaft samples coming from the central part of the biomaterial model of long osteoporotic bones (ca. 10% deproteinized) after cutting off both bone epiphyses, in the frequency range from 20 Hz to 10 kHz, are presented in FIG. 5. The numbering of the long bone samples corresponds to their location with respect to the beginning of the middle part (i.e. with respect to the limit cross-section of the cut off proximal epiphysis) of the examined experimental model of long bone.



RYS. 5. Wartości modułu impedancji |Z| [Ω] niektórych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (częściowo odbiałczona kość, o ok. 10%) w funkcji częstotliwości w zakresie: A) od 20 Hz do 3 kHz i B) od 20 Hz do 500 Hz (początkowy zakres charakterystyk w powiększeniu).

FIG. 5. The values of electrical impedance |Z| [Ω] of some bone shaft samples from the biomaterial model of osteoporotic long bone (partially deproteinized; about 10%) as a function of frequency, ranging from: A) 20 Hz to 3 kHz and B) 20 Hz to 500 Hz (initial range of the characteristics in the inset).

Na podstawie zmierzonych wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| próbek trzonowo-kostnych badanego modelu doświadczalnego można stwierdzić, że wartości modułu impedancji |Z| tych próbek wyraźnie maleją (tj. średnio o ok. 140 Ω) w zakresie częstotliwości od 20 Hz do 500 Hz (RYS. 5B). W zakresie częstotliwości od 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości |Z1| są niewielkie; powyżej częstotliwości 2 kHz wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| praktycznie nie zmieniają się. Oznacza to, że wartość reaktancji elektrycznej X(ω=2πf) próbek trzonowo-kostnych badanego modelu doświadczalnego jest w zakresie powyżej częstotliwości 2 kHz praktycznie równa zeru, a wartość modułu impedancji |Z| badanych próbek modelowej kości długiej w zakresie częstotliwości powyżej 2 kHz jest praktycznie równa wartości rezystancji R [Ω] tych próbek (gdyż R nie jest funkcją częstotliwości): $R(\omega) = const = |Z| dla f \ge 2 kHz.$

Na wykresach (RYS. 6 A i B) przedstawiono przykładowe wyniki pomiarów wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| próbek trzonowo-kostnych badanego biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (modelowa kość odbiałczona o ok. 10%) po odcięciu obu części nasadowych, w zależności od lokalizacji badanej próbki oznaczonej numeracją postępującą od krańcowego przekroju poprzecznego odciętej nasady bliższej kolejno wzdłuż długości trzonu kości; wyniki dotyczą dwóch wybranych częstotliwości: 100 Hz oraz 10 kHz.



RYS. 6. Wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| [Ω] próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich osteoporotycznych (w ok. 10% odbiałczona kość) po odcięciu obu części nasadowych, w zależności od lokalizacji badanej próbki wzdłuż długości trzonu kości, dla częstotliwości: A) 100 Hz oraz B) 10 kHz. FIG. 6. The measured values of the electrical im-

pedance modulus $|Z|[\Omega]$ of bone shaft samples of the examined biomaterial model of osteoporotic long bone (bone deproteinized by ca. 10%) after cutting off both epiphyses, as a function of the specimen location along the long bone shaft for frequencies of A) 100 Hz and B) 10 kHz.

As it can be seen from the diagrams presented in FIG. 5, the measured values of the electrical impedance |Z| [Ω] of long bone shaft samples from the investigated experimental model of osteoporotic long bone decreased significantly (averagely by 140 Ω) in the frequency range from 20 Hz to 500 Hz (FIG. 4B). In the frequency range from 500 Hz to 2 kHz, the changes of the measured |Z| values were small; above 2 kHz, the measured values of the electrical impedance modulus |Z| practically did not change. This means that the values of the electrical reactance X (ω =2 π f) of bone shaft samples of the examined experimental model are practically equal to zero in the range above 2 kHz, and the value of the impedance modulus |Z| of these samples in the frequency range above 2 kHz is practically equal to their resistance R [Ω] (since R is not a function of frequency): $R(\omega) = const = |Z|$ for $f \ge 2kHz$.

FIGs. 6 A and B present the results (for frequencies 100 Hz and 10 kHz) of measurements of the values of the electrical impedance modulus |Z| of bone shaft samples of the examined biomaterial model of osteoporotic long bones (bone deproteinized by ca. 10%) as a function of the specimen position (location) along the long bone shaft, as counted from the side of the cut off proximal epiphysis.

Z przedstawionych na RYS. 6 wykresów rozkładu wartości modułu impedancji elektrycznej |Z| wzdłuż długości trzonu badanej modelowej kości długiej po odcięciu obu jej części nasadowych, wynika wyraźnie, że wartości modułu impedancji |Z| próbek kostnych odpowiadające części środkowej trzonu badanej kości różnią się o ok. 40-50% od wartości odpowiadającym jej krańcowym segmentom. Te krańcowe segmenty badanej środkowej części modelowej kości długiej odpowiadają tzw. przynasadom kości długiej, przy czym przynasada bliższa znajduje się pomiędzy nasadą bliższą (tu odciętą) a trzonem kości długiej, natomiast przynasada dalsza – analogicznie: pomiędzy nasadą dalszą (tu odciętą) a trzonem. Z obserwacji powyższej wypływa wniosek, że jeśli chcemy otrzymać reprezentatywne wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej |Z₁| [Ω/cm] (tj. impedancji odniesionej do jednostki długości kości) dla trzonu badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej, to powinniśmy wziąć pod uwagę wartości modułu impedancji jednostkowej |Z₁| [Ω/cm] próbek trzonowo-kostnych, odpowiadające części środkowej badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej, przedstawione odpowiednio na RYS. 7 A i B.

In FIG. 6, the distributions of the values of the electrical impedance modulus |Z| along the length of the examined biomaterial model of long bone are shown, and reveal that the values of the electrical impedance modulus |Z| corresponding to the medial part of the examined long bone shaft differ by about 40-50% from the values of the electrical impedance modulus |Z| corresponding to the terminal segments. These terminal segments of the examined medial part of long bone shaft were recognized (identified) as the metaphyses of long bone; the proximal metaphysis is located between the proximal epiphysis and the long bone shaft, while the distal metaphysis is located between the distal epiphysis and the long bone shaft. This allowed us to conclude that, for the assessment of representative values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω /cm] (i.e. referred to the unit of length of long bone) of the bone shaft of the examined model of osteoporotic long bone, one should take into account the results obtained for the bone shaft specimens from the medial regions of the examined shaft, as shown in FIGs. 7 A and B.



RYS. 7. Wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω /cm] odpowiadające części środkowej badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej (w ok. 10% odbiałczona kość), w zależności od lokalizacji badanych próbek (o dł. 1cm) wzdłuż trzonu kości długiej, przy częstotliwości: A) 100 Hz oraz B) 10 kHz. FIG. 7. The values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω /cm] corresponding with the medial part of the examined model of osteoporotic long bone (deproteinized by about 10%), as a function of the bone sample location along the long bone shaft; the results show frequencies of A) 100 Hz and B) 10 kHz.

Z przedstawionych na RYS. 7 wykresów rozkładu wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ wzdłuż długości badanego modelu kości długiej osteoporotycznej oraz z wyznaczonych linii trendu wynika, że:

1) średnia wartość modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω /cm] odpowiadająca części środkowej badanej kości długiej, wynosi ok. 670 Ω /cm przy częstotliwości 100 Hz i jest względnie stała wzdłuż trzonu kości; zmienność tej wartości średniej wzdłuż trzonu badanej kości długiej jest nieznaczna – poniżej 1%;

2) średnia wartość modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω /cm] odpowiadająca części środkowej badanej kości długiej wynosi ok. 630 Ω /cm przy częstotliwości 10 kHz, zmienność tej wartości średniej wzdłuż trzonu badanej kości długiej jest niewielka – poniżej 5%.

Lokalne obniżenie wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej |Z₁| w stosunku do linii trendu wyznaczającej wartość średnią modułu tej impedancji, widoczne w środkowej części trzonu badanej modelowej kości długiej (udowej), wynika prawdopodobnie z istniejącego w tym miejscu przyczepu mięśnia przywodzącego udo i całą kończynę dolną (m. przywodziciel długi uda, *m. adductor femoris longus*) i aktywności tego mięśnia. Pociąganie przez ten mięsień materiału fazy stałej kości korowej w środkowej części trzonu kości udowej może prowadzić do lokalnego poszerzenia przestrzeni porowej kości, co skutkuje zmniejszeniem wartości rezystancji i impedancji elektrycznej kości w tym podobszarze. FIG. 7 shows the distributions of the values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω /cm] along the length of the examined long bone biomaterial model. From the plotted trend lines, it was found that:

1) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ corresponding to the middle part of the examined bone is approximately equal to 670 Ω /cm at a frequency of 100 Hz and is relatively constant along bone shaft. The variability of this mean value along the examined long bone shaft is negligible, i.e. less than 1%.

2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ corresponding to the middle part of the examined bone is approximately equal to 630 Ω /cm at a frequency of 10 kHz; the variability of this mean value along the examined long bone shaft is small, i.e. less than 5%.

The local decrease in the values of the unit electrical impedance modulus $|Z_1|$ relative to the trend line defining the mean value of that impedance modulus, seen in the middle part of shaft of the examined model long bone (femur), is probably due to a muscle attachment existing in this location and the activity of this muscle – it is the attachment of the muscle adducting the thigh and the entire lower limb (*musculus adductor femoris longus*). Stretching the solid phase material of cortical bone by this muscle in the middle part of femur shaft can lead to a local widening of the bone pore space, which results in a decrease in the value of electrical resistance and impedance of bone in this region.

W celu weryfikacji postawionej wyżej roboczej hipotezy badawczej planujemy przeprowadzenie pełnego badania doświadczalnego właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym (na większej liczbie modelowych trzonów kości długich) obejmujące również bezpośrednie badania struktury wewnętrznej próbek trzonowo-kostnych, tj. określenie względnej objętości materiału fazy stałej tych próbek.

Znajomość wartości parametrów struktury wewnętrznej badanych próbek trzonowo-kostnych umożliwi właściwe zinterpretowanie otrzymanych wyników pomiarów wartości jednostkowej impedancji elektrycznej trzonów kości długich i pozwoli ilościowo określić istniejące uwarunkowanie elektrycznych właściwości trzonów kości długich poprzez wartości parametrów struktury kości.

Wnioski

Na podstawie doświadczalnej analizy porównawczej kinetyki badanych procesów preparatyki kości zaproponowano do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym: 1) odbiałczanie kości z użyciem 7% roztworu nadtlenku wodoru (H₂O₂) – dla wytworzenia modelu doświadczalnego kości w stanie obniżonego kościotworzenia (kość osteoporotyczna), 2) odwapnianie kości z użyciem 0,5 M roztworu kwasu solnego (HCI) – dla wytworzenia modelu doświadczalnego kości w stanie obniżonej mineralizacji (stan osteomalacji).

W wyniku przeprowadzonej pilotażowej eksperymentalnej oceny właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich osteoporotycznych w zakresie niskich częstotliwości (20 Hz do 10 kHz) można stwierdzić, że: 1) wartości modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ [Ω /cm] trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej maleją bardzo wyraźnie w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do ok. 500 Hz; od częstotliwości 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości |Z1| są niewielkie, a powyżej częstotliwości 2 kHz wartość modułu impedancji jednostkowej |Z1| praktycznie nie zależy od zmian częstotliwości; 2) średnia wartość modułu impedancji elektrycznej jednostkowej |Z1| trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej okazała się względnie stała wzdłuż długości trzonu kości i wynosiła ok. 670 Ω/cm dla częstotliwości 100 Hz oraz ok. 630 Ω/cm dla częstotliwości 10 kHz; lokalne odchylenie poniżej wartości średniej modułu tej impedancji może być spowodowane obecnością w tym miejscu przyczepu mięśnia szkieletowego oraz lokalnym rozciąganiem materiału fazy stałej kości przez aktywny mięsień, co skutkuje lokalną zmianą wewnętrznej struktury kostnej.

Otrzymane pilotażowe wyniki doświadczalnego badania właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym wymagają potwierdzenia w pełnym badaniu doświadczalnym na większej ilości modelowych kości długich osteoporotycznych (oraz nie w pełni zmineralizowanych), obejmującym również ilościową ocenę wewnętrznej struktury badanych próbek trzonowo-kostnych (m.in. określenie względnej objętości materiału fazy stałej tych próbek, ich porowatości, itd.) w celu doświadczalnego określenia ilościowej zależności pomiędzy właściwościami strukturalno-elektrycznymi trzonów kości długich a ich gęstością/porowatością – pod kątem patentowanej nieinwazyjnej metody wyznaczania gęstości i parametrów porosprężystych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych [20,21].

Podziękowania

Praca finansowana w ramach badań statutowych Wydziału Matematyki, Fizyki i Techniki Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy. In order to verify the working research hypothesis stated above, we are planning to carry out a full experimental study of the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological state (on a larger number of model long bones), including also a direct examination of the internal structure of bone shaft samples, i.e. a determination of the relative volume of the solid phase material of these bone samples.

With known values of the parameters of the internal structure of bone shaft samples, it will be possible to appropriately interpret the results of measurements of the unit electrical impedance modulus values of long bone shafts. This will allow us to quantitatively determine the existing relationship between the electrical properties of long bone shafts and the parameters of bone structure.

Final results

On the basis of an experimental comparative analysis of the kinetics of bone preparation processes, we can propose biomaterial experimental models of the long bones in a pathological stage: deproteinization using a 7% solution of hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce a model of bone in a state of reduced osteogenesis and decalcification with 0.5 M hydrochloric acid (HCI) to produce a model of insufficiently mineralized bone.

Having concluded the pilot experimental evaluation of the structural-electrical properties in a low frequency range (20 Hz to 10 kHz) of the model long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state, it can be stated that:

1) The values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω /cm] of the bone shaft of the model osteoporotic long bone decrease very clearly as a function of frequency in the range from 20 Hz to ca. 2 kHz; from the frequency 500 Hz to 2 kHz, the changes in the $|Z_1|$ value are small, and above 2 kHz the $|Z_1|$ value practically does not depend on frequency changes.

2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ of the bone shaft of the model osteoporotic long bone was found to be relatively constant along the length of the bone shaft and was about 670 Ω /cm at a frequency of 100 Hz and about 630 Ω /cm at a frequency of 10 kHz; a local decrease below the mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ of bone (femur) shaft may be caused by the presence of the skeletal muscle attachment at this site and the stretching of the solid phase material of bone by this muscle, which results in a local change in the bone's internal structure.

The experimental results of the preliminary study on the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state require confirmation in a full experimental study performed on a larger number of model osteoporotic long bones (and also on incompletely mineralized bones), also including a quantitative assessment of the internal structure of examined bone shaft samples (i.e. determination of the relative volume of solid phase material in bone shaft samples, their porosity, etc.) in order to determine experimentally the quantitative relationship between the structural-electrical properties of long bone shafts and their density/porosity in the context of a patented non-invasive method for the determination of the density and poroelastic parameters of normal and osteoporotic long bones [20,21].

Acknowledgements

This work was supported by the statutory research fund of the Faculty of Mathematics, Physics and Technology, the Casimir the Great University in Bydgoszcz (Poland).

••••• Piśmiennictwo

[1] Brighton C.T., Wang W., Seldes R., Guihong G., Pollack R.: Signal transduction in electrically stimulated bone cells. Journal of Bone and Joint Surgery 83A(10) (2001) 1514-1523.

[2] Uklejewski R.: O efektach elektromechanicznych w porowatej kości zbitej wypełnionej płynem fizjologicznym i efekcie akustoelektrycznym w trzonach kości długich mokrych, /rozprawa habili. s.203/. Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN. Wyd. IBIB PAN Nr 35 Warszawa 1994.

[3] Sierpowska J., Lammi M.J., Hakulinen M.A., Jurvelin J.S., Lappalainen R., Töyräs J.: Effect of human trabecular bone composition on its electrical properties. Medical Engineering & Physics 29(8) (2007) 845-852.

[4] Sierpowska J., Töyras J., Hakulinen M.A., Saarakala S., Jurvelin J.S., Lappalainen R.: Electrical and dielectric properties of bovine trabecular bone relationships with mechanical properties and mineral density, Physics in Medicine and Biology 48 (2003) 775-786.
[5] Sierpowska J., Hakulinen M.A., Töyras J., Day J.S., Weinans H., Jurvelin J.S., Lappalainen R.: Interrelationships between electrical properties and microstructure of human trabecular bone, Physiological Measurement 51(20) (2006) 5289-5303.

[6] De Mercato G., García Sánchez F.J.: Variation of the electric properties along the diaphysis of bovine femoral bone. Medical & Biological Engineering & Computing 29(4) (1991) 441-446.

[7] Meaney P.M., Zhou T., Goodwin D., Golnabi A., Attardo E.A., Paulsen K.D.: Bone Dielectric Property Variation as a Function of Mineralization at Microwave Frequencies, International Journal of Biomedical Imaging 2012 (2012):649612 doi: 10.1155/2012/649612.

[8] Kosterich J.D., Foster K.R., Pollack S.R.: Dielectric properties of fluid-saturated bone – the effect of variation in conductivity of immersion fluid. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 31(4) (1984) 369-374.

[9] Chakkalakal D.A., Johnson M.W.: Electrical properties of compact bone. Clinical Orthopaedics and Related Research 161 (1981) 133-145.

[10] Chakkalakal D.A.: Electrical conductivity of compact bone in vitro. Proceedings of Society for Biomaterials 8th Annual Meeting (1982) 15.

[11] Black J., Mattson RU.: Relationship between porosity and mineralization in the Haversian osteon. Calcified Tissue International 34 (1982) 332-336.

[12] Kosterich J.D., Foster K.R., Pollack S.R.: Dielectric permittivity and electrical conductivity of fluid saturated bone. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 30 (1983) 81-86.

[13] Chakkalakal D.A., Johnson M.W., Harper R.A., Katz J.L.: Dielectric properties of fluid-saturated bone. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 27 (1980) 95-100.

[14] Uklejewski R., Czapski T.: Drobot's algebraic theory of dimensional analysis in construction of system of mechanoelectric analogies. Application to the problems of acoustoelectric waves propagation in porous long bones. PAMM 4(1) (2004) 588-589.

[15] Uklejewski R., Czapski T.: Modele obwodowy i obliczeniowy przenoszenia drgań sprężystych w kościach długich wraz z towarzyszącymi napięciami i prądami elektrycznymi – wstępne symulacje komputerowe. Materiały XI Konferencji Naukowej "Zastosowanie Komputerów w Elektrotechnice ZKwE' 2006" (2006) 203-204.

[16] Czapski T.: Analiza parametryczna dla procesu generowania potencjałów elektrycznych towarzyszących przenoszeniu podłużnych drgań w kościach długich prawidłowych i osteoporotycznych. Materiały XII Konferencji "Zastosowanie Komputerów w Elektrotechnice ZkwE'2007", (2007) 125-126.

[17] Czapski T.: Modelowanie i komputerowa analiza elektrokustycznych zjawisk w kościach długich prawidłowych i osteoporotycznych, PhD Thesis, Poznan University of Technology, Faculty of Electrical Engineering, Poznan (2008).

[18] Uklejewski R., Czapski T.: Computational Analysis of Strain Generated Potentials (SGPs) associated with Transmission of Acousto-Elastic Vibrations in Normal and Osteoporotic Long Bones. International Conference of the Polish Society of Biomechanics "Biomechanics 2010" (2010) 239-240. [19] Uklejewski R., Czapski T.: Electric Transmission Line Approach to Non-Electric Transmission Lines. In: Transmission Lines: Theory, Types and Applications (Ed.: Welton D.M.). ISBN: 978-1-61761-300-5, Nova Science Publishers, USA, 2010.

[20] Zgłoszenie patentowe nr P382344 w UP RP: Sposób nieinwazyjnego określania gęstości i parametrów porosprężystych kości długiej, autorzy wynalazku: Uklejewski R., Czapski T. /w trakcie procedury patentowej/.

[21] Patent application No. Euro-PCT/PL2008/000032 in European Patent Office: Uklejewski R., Czapski T., A method of the non-invasive determination of density and poroelasticity parameters of the long bone /actually patented in EPO in Munich/.

[22] Bertazzo S., Bertran C.A.: Effect of hydrazine deproteination on bone mineral phase: a critical view. Journal of Inorganic Biochemistry 102 (2008) 137-145.

[23] Castro-Ceseña A.B., Novitskaya E.E., Chen P., del Pilar Sánchez-Saavedra M., Hirata G.A., McKittrick J.: Comparison of demineralized and deproteinized bone, Materials Research Society Proceedings 1301 (2011) DOI: http://dx.doi.org/10.1557/ opl.2011.194.

[24] Chen P.Y., McKittrick J.: Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 4 (2011) 961-973.

[25] Chen P.Y., Toroian D., Price P.A., McKittrick J.: Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone, Calcified Tissue International 88 (2011) 351-361.

[26] Hui-fen X., Hui-yu H., Xiao-xue T, Jie C.: Biocompatibility of xenogenic bone materials prepared by different ways. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research 15(47) (2011) 8749-8752.

[27] Bowman S.M., Zeind J., Gibson L.J., Hayes W.C., McMahon T.A.: The tensile behavior of demineralized bovine cortical bone. Journal of Biomechanics 29 (1996) 1497-1501.

[28] Castro-Ceseña A.B., Novitskaya E.E., Chen P., Hirata G.A., McKittrick J.: Kinetic studies of bone demineralization at different HCI concentrations and temperatures, Materials Science and Engineering C 31 (2011) 523-530.

[29] Figueiredo M., Cunha S., Martins G., Freitas J., Judas F., Figueiredo H.: Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. Chemical Engineering Research and Design 89 (2001) 116-124.

[30] Lewandrowski K.U., Tomford W.W., Michaud N.A., Schomacker K.T., Deutsch T.F.: An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. Calcified Tissue International 61 (1997) 294-297.

[31] Lewandrowski K.U., Venugopalan V., Tomford W.W., Schomacker K.T., Mankin H.J., Deutsch T.F.: Kinetics of cortical bone demineralization: controlled demineralization - a new method for modifying cortical bone allografts. Journal of Biomedical Materials Research 31 (1996) 365-372.

[32] Tinling S.P., Giberson R.T., Kullar R.S.: Microwave exposure increases bone demineralization rate independent of temperature. Journal of Microscopy 215 (2004) 230-235.

[33] Suvarna K., Layton C., Bancroft J.: Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7th Edition. New York: Churchill Livingstone, 2013.

[34] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193 (1951) 265-275.

[35] Rosen A.D.: End-point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. Stain Technology 56 (1981) 48-49.

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNE TYTANU STOSOWANEGO NA IMPLANTY DO KONTAKTU Z KRWIĄ

Anita Kajzer*, Zbigniew Paszenda, Marcin Basiaga, Witold Walke, Wojciech Kajzer

Katedra Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych, Politechnika Śląska,

UL. GENERAŁA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE * E-MAIL: ANITA.KAJZER@POLSL.PL

Streszczenie

Celem prowadzonych badań było określenie wpływu procesu utleniania anodowego powierzchni na własności fizykochemiczne tytanu. Wyniki badań stanowią podstawę do doboru optymalnych warunków utleniania anodowego do zastosowań na implanty do kontaktu z krwią. W ramach badań dla próbek w stanie wyjściowym oraz poddanych procesowi utleniania przy potencjałach od 40 V do 100 V co 10 V przeprowadzono ocenę zwilżalności powierzchni, badania potencjodynamiczne oraz impedancyjne. Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono, że niezależnie od zastosowanego potencjału anodyzacji proces ten spowodował korzystne zwiększenie się potencjału korozyjnego E_{kor} oraz zwiększenie oporu polaryzacyjnego R_o w odniesieniu do próbek w stanie wyjściowym. Natomiast optymalny wariant przygotowania powierzchni, która będzie kontaktowała się z płytkami krwi stanowi utlenianie anodowe przy potencjale 100 V. Spowodowało ono znaczny wzrost oporu przejścia jonów na granicy faz R_{ct} oraz wyeliminowanie elementu Warburga z układu zastępczego w stosunku do pozostałych analizowanych wariantów, co świadczy o bardzo dobrych własnościach ochronnych wytworzonej w ten sposób warstwy tlenkowej. Dla tak przygotowanej powierzchni stwierdzono najmniejszą zwilżalność oraz największą odporność korozyjną, co zapewnia zmniejszoną aktywację oraz adhezję płytek krwi do podłoża oraz biotolerancję w analizowanym środowisku. Wiadomo, że materiał o wysokim potencjale trombogennym powoduje adsorpcję materiału biologicznego na powierzchni oraz aktywację układu trombocytarnego, w wyniku czego wzrasta ryzyko powstawania między innymi powikłań zatorowo-zakrzepowych. Dlatego też przeprowadzone badania stanowią etap wstępny do analizy trombogenności powierzchni metodą Impact-R.

Słowa kluczowe: tytan cpTi, utlenianie anodowe, zwilżalność, odporność korozyjna, obróbka powierzchniowa

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 23-30]

INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATION ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF TITANIUM USED FOR BLOOD-CONTACTING IMPLANTS

Anita Kajzer*, Zbigniew Paszenda, Marcin Basiaga, Witold Walke, Wojciech Kajzer

DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES ENGINEERING, SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. GENERALA CHARLESA DE GAULLE'A 72, 44-800 ZABRZE, POLAND * E-MAIL: ANITA.KAJZER@POLSL.PL

Abstract

The aim of the research carried out was the determination of the influence of surface anodic oxidation process to physiochemical properties of titanium. Results form a basis for selecting optimum conditions of anodic oxidation for implants to be in direct contact with blood. The evaluation of surface wettability, potentiodynamical and impedance tests were conducted for samples at their initial condition and after they were subjected to the anodic oxidation process from 40 to 100 V every 10 V. The results revealed that regardless of the anodizing parameters applied the process has caused an advantageous decrease in corrosion potential Ekor and an decrease in polarisation resistance R_n in comparison to samples at their initial state. The optimum variant of surface that is meant to exist in direct contact with blood consists of anodic oxidation at 100 V. It has caused a substantial increase in ions transition residence R_{ct}, increase at the interphase as well as elimination of the Warburg element from a substitute system compared to the remaining variants being analysed. This demonstrates the very good protective properties of an oxide layer obtained in this way. In the case of a surface treated in such a way, the lowest wettability and the highest corrosion residence have been found thus assuring a decreased activation and blood platelets adhesion to the substrate as well as higher biotolerance in the environment. It is known that materials having a high thrombogenic potential cause the adsorption of biological matter on the surface and the activation of thrombocytic system causing the increase of the risk of embolic and clot complications. That is why researches make an initial stage for the analysis of thrombogenic properties of surfaces according to the Impact-R method.

Keywords: titanium cpTi, anodic oxidation, wettability, corrosion resistance, surface treatment

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 23-30]

24 Wprowadzenie

Od materiałów stosowanych na implanty do kontaktu z krwią, a w szczególności na elementy zastawek serca oczekuje się odpowiednich właściwości mechanicznych, chemicznych i biologicznych. Materiały, z których są one wytwarzane nie mogą powodować niszczenia elementów morfotycznych krwi, oddziaływać z otaczającymi tkankami czy wydzielać szkodliwych substancji do krwiobiegu. Nie powinny także sprzyjać adsorpcji składników krwi. Muszą minimalizować możliwość wykrzepiania krwi, wykazywać dużą odporność na zużycie mechaniczne i strukturalne oraz charakteryzować się hemokompatybilnością, na którą w znacznym stopniu wpływa sposób przygotowania powierzchni [1,2]. Dlatego też bardzo często wykorzystywanym do tego celu materiałem metalowym jest tytan, którego głównymi zaletami są dobra odporność na korozję oraz biotolerancja. Cechy te zawdzięcza on przede wszystkim samorzutnie tworzącej się zwartej i jednorodnej warstewce tlenkowej TiO₂, która charakteryzuje się niskim przewodnictwem elektrycznym, termodynamiczną stabilnością i słabą tendencją do przechodzenia w stan jonowy. Jej obecność zapewnia wysoką odporność na korozję, a jej grubość nie przekracza 10 nm, przez co jest bardziej podatna na odkształcenia. Poprzez zmianę właściwości implantu można ingerować w procesy zachodzące na granicy implant-środowisko. W celu ujednorodnienia warstewki tlenku tytanu i wzrostu odporności na działanie środowiska biologicznego, tytan poddawany jest zabiegom uszlachetniania, które składają się z jednego lub wielu zabiegów obróbki powierzchni. Do tych zabiegów należy m.in. utlenianie anodowe, które jest procesem wytwarzania warstw pasywnych, najczęściej tlenkowych na powierzchni metali i stopów w roztworach wodnych elektrolitów przy oddziaływaniu pola elektrycznego [3,4]. Zastosowanie podczas tego procesu różnych potencjałów napięciowych może wpływać na uzyskanie zmiennych własności fizykochemicznych powierzchni. Dlatego też celem przeprowadzonych badań był dobór optymalnych parametrów procesu utleniania anodowego w celu uzyskania warstwy powierzchniowej o zwiększonej odporności korozyjnej oraz małej zwilżalności powierzchni umożliwiającej jej zastosowanie na implanty do kontaktu z krwią.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowił czysty tytan cpTi Grade 4 pobrany z preta o średnicy d = 14 mm. Próbki poddano następującym modyfikacją powierzchni: szlifowaniu, polerowaniu elektrolitycznemu (oznaczone jako próbki w stanie wyjściowym) oraz utlenianiu anodowemu. Proces szlifowania mechanicznego realizowano z wykorzystaniem wodnych papierów ściernych ze ścierniwem karborundowym o granulacji 500. Następnie próbki poddano procesowi polerowania elektrolitycznego, który prowadzono w kapieli na bazie kwasu chromowego przy gęstości prądu i = 10÷30 A/cm². W końcowym etapie przeprowadzono proces utleniania anodowego w elektrolicie na bazie: kwasów fosforowego i siarkowego przy potencjałach od 40 V do 100 V co 10 V. Próbki oznaczono odpowiednio: stan wyjściowy oraz Ti 40V ÷ Ti 100V. Do oceny własności fizykochemicznych autorzy zaproponowali badania: zwilżalności powierzchni, potencjodynamiczne oraz impedancyjne [5-10].

Przed przystąpieniem do badań odporności korozyjnej na wszystkich wytypowanych próbkach przeprowadzono ocenę zwilżalności powierzchni. Pomiar kąta zwilżania kroplą cieczy naniesioną na warstwę wierzchnią materiału został wykonany w temperaturze pokojowej na stanowisku badawczym składającym się z goniometru SURFTENS UNI-VERSAL firmy OEG oraz komputera z oprogramowaniem Surftens 4.5 do analizy zarejestrowanego obrazu kropli.

Introduction

As far as materials intended for implants being in contact with blood are concerned, and elements of cardiac valves in particular, proper mechanical, chemical and biological properties are expected. The materials from which they are made should not cause deterioration of morphotic blood elements, react with surrounding tissue or release harmful substances to blood. They should not adsorb blood elements. On the contrary, they should minimize the possibility of blood clotting, display high resistance to mechanical and structural wear and be characterised by hemocompatibility that is influenced by their surface treatment to a high degree [1,2]. Therefore, titanium belongs to the most commonly used metallic materials, characterised by high corrosion resistance and biotolerance. Titanium owes this virtue to spontaneously occurring compact and homogenous oxide TiO₂ coating that is characterised by low electric conductivity, thermodynamic stability and low tendency for the transition in ionic state. Its presence assures high corrosion resistance and its thickness does not exceed 10 nm, which means that it is more prone to deformations. By changes of implant properties it is possible to interfere in processes occurring at implant-environment interface. To make titanium oxide more homogenous and improve its residence to the biological environment titanium is subjected to refining treatment comprising one or several operations of surface treatment. Among other things, anodic oxidation is recognised as one of them. The process consists in creating passive oxide coatings on the surface of metals and alloys carried out in aqueous electrolyte solutions under the influence of electric field [3,4]. The application of different potential values might influence surface physiochemical properties. Hence, the aim of the research was selection of optimum parameters of the process of anodic oxidation to obtain a surface coating having an improved corrosion resistance and low wettability that guarantee implants are suitable for contact with blood.

Materials and method

Pure cpTi Grade 4 titanium taken from a bar having a diameter d = 14 mm was the initial material to be tested. The samples were subjected to the following modifications: grinding, electrolytic polishing (described as samples in their initial stage) and anodic oxidation. Mechanic polishing was done with the use of water abrasive papers with silicon carbide 500 as abrasive material. Next, samples were electrolytically polished in a bath of chromic acid using the current density i = 10 ÷ 30 A/cm². Anodic oxidation in the electrolyte based on phosphoric and sulphuric acids with voltage ranging from 40 V to 100 V every 10 V was the final stage. Samples were marked respectively as follows: initial state, Ti_40V ÷ Ti_100V. To evaluate physiochemical properties the authors proposed the following tests: surface wettability, potentiodynamic and impedance tests [5-10].

Before tests of corrosion resistance all samples were tested for their surface wettability. The measurement of an angle of wetting with a drop of liquid deposited on the material surface was conducted at room temperature on a testing post consisting of OEG's SURFTENS UNIVERSAL goniometer and a computer equipped with the Surftens 4.6 software created for the analysis of a registered drop picture.

5 drops of distilled water, each having the volume of $1.5 \,\mu$ l, were deposited on the surface of each sample. Each measurement operation lasted 60 s. Next, the measured values of wetting angles were presented as mean values and standard deviation.

Na powierzchnię każdej z próbek naniesiono 5 kropli wody destylowanej, każda o pojemności 1,5 µl. Czas trwania jednego pomiaru wynosił 60 s. Następnie oznaczone wartości kątów zwilżania zostały przedstawione jako wartości średnie z odchyleniem standardowym.

Kolejno przeprowadzono badanie odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną rejestrując krzywe polaryzacji zgodnie z zaleceniami normy [11]. Zestaw pomiarowy składał się z potencjostatu VoltaLab PGP201, elektrody odniesienia (nasycona elektroda kalomelowa SCE typu KP-113), elektrody pomocniczej (elektroda platynowa typu PtP-201), anody (badana próbka) oraz komputera PC wraz z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Przed przystąpieniem do badań powierzchnie wszystkich próbek zostały oczyszczone w 96% alkoholu etylowym z wykorzystaniem płuczki ultradźwiękowej SONICA 1200M przez czas ok. t = 6 min. Badania korozyjne rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia E_{OCP} w warunkach bezprądowych. Krzywe polaryzacji rejestrowano od wartości potencjału początkowego $E_{start} = E_{OCP} - 100$ mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 0,167 mV/s. Po uzyskaniu gęstości prądu anodowego 1 mA/cm² zmieniano kierunek polaryzacji. Na podstawie uzyskanych krzywych wyznaczono potencjał korozyjny E_{corr} oraz korzystając z metody Sterna wartość oporu polaryzacyjnego R_n.

W celu uzyskania dodatkowych informacji o własnościach fizykochemicznych powierzchni analizowanych próbek przeprowadzono również badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej. Pomiary przeprowadzono z wykorzystaniem systemu pomiarowego Auto Lab PGSTAT 302N wyposażonego w moduł FRA2 (Frequency Response Analyser). Zastosowany układ pomiarowy umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości 10⁴ ÷ 10⁻³ Hz. Amplituda napięcia sinusoidalnego sygnału pobudzającego wynosiła 10 mV. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układu zastępczego. Na tej podstawie wyznaczono wartości liczbowe oporności R i pojemności C analizowanych układów. Widma impedancyjne badanego układu przedstawiono w postaci diagramów Nyquista dla różnych wartości czestotliwości oraz w postaci diagramów Bode. Otrzymane spektra EIS interpretowano po

dopasowaniu metoda najmniejszych kwadratów do zastępczego układu elektrycznego. Wszystkie badania elektrochemiczne zrealizowano w sztucznym osoczu o temperaturze $T = 37 \pm 1^{\circ}CipH = 7,0 \pm 0,2$ (TABELA1). Następnie wszystkie uzyskane wartości porównano z wynikami próbek w stanie wyjściowym.

Next, tests of resistance to pitting corrosion using the potentiodynamic method consisting of registration of polarization curves in accordance with the standard recommendations were conducted [11]. The measurement set up consisted of VoltaLab's PGP201 potentiostat, reference electrode (SCE type KP-113 saturated calomel electrode) auxiliary electrode (platinum electrode type PtP-201), anode (tested sample) and of a PC equipped with VoltaMaster 4 software. Before the start of tests the surface of all samples was cleaned using 96 per cent ethanol with the application of the SONICA 1200M ultrasonic washer for t = 6 min. Corrosion testing was started with the setting of opening potential E_{ocp} under no current condition. Polarisation curves were registered from the value of initial potential $E_{start} = E_{ocp}$ to 100 mV. Change of potential ran in the direction of the anode with the speed of 0.167 mV/s. After the density of the anode current reached the level 1 mA/sq cm, the polarisation direction was changed. On the basis of the obtained curves, corrosion potential E_{corr} and polarisation resistance R_p value using Stern's method was determined.

In order to obtain additional information on physiochemical properties of surfaces of tested samples further research with the use of electrochemical impedance spectroscopy was conducted. Measurements were taken using AutoLab's PGSTAT 302N measurement system equipped additionally with the Frequency Response Analyser FRA2 module. The system allowed for tests being carried out in the frequency range of 10⁴ ÷ 10⁻³ Hz. The amplitude of signal sinusoidal actuating tension amounted to 10 mV. Impedance system spectra were determined and the obtained data were adjusted to the substitute set up. On this basis numerical values of resistance R and capacity C of the analysed systems were determined. Impedance spectra of the tested system were presented in the form of Nyquist diagrams for different frequency values and in the form of Bode's diagrams. The obtained EIS spectra were interpreted after they had been adjusted according to the method of the smallest squares to the substitute electric system. All electrochemical tests were carried out in artificial plasma having a temperature T = $37\pm1^{\circ}$ C and pH = 7.2 ± 0.2 (TABLE 1).

Then, all obtained values were compared with results concerning samples at their initial state.

TABELA 1. Skład chemiczny sztucznego osocza. TABLE 1. Artificial plasma chemical composition.

Związek chemiczny Chemical compound	NaCl	CaCl ₂	KCI	MgSO ₄	NaHCO₃	Na ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄
Stężenie Concentration [g/dm ³]	6.800	0.200	0.400	0.100	2.200	0.126	0.026

Wyniki i dyskusja

Przykładowe zdjęcia kropli wody destylowanej podczas pomiaru przedstawiono na RYS. 1. Natomiast wyniki pomiarów kata zwilżania dla wszystkich analizowanych powierzchni przedstawiono w TABELI 2.

Results and discussion

Sample photographs of a drop of distilled water during the measurement are presented in FIG. 1. Results of wetting angle measurement for each surfaces being analysed are presented in TABLE 2.



TABELA 2. Wyniki pomiarów kąta zwilżania. TABLE 2. Wetting angle measurement results.

Sposób przygotowania próbki Sample preparation	Średnia wartość kąta zwilżania Mean value of wetting angle, θ°	Odchylenie standardowe Standard deviation, °
Ti_stan wyjściowy/ Ti_initial state	56.95	±0.63
Ti_40V	38.66	±1.08
Ti_50V	50.65	±0.91
Ti_60V	49.09	±0.92
Ti_70V	47.70	±0.68
Ti_80V	79.27	±0.96
Ti_90V	66.50	±0.65
Ti_100V	81.23	±1.11



RYS. 2. a) Krzywe polaryzacyjne tytanu w stanie wyjściowym oraz poddanego modyfikacji powierzchni, b) obszar potencjałów korozyjnych. FIG. 2. a) Polarisation curves regarding titanium at initial condition and after surface modification, b) area of corrosion potentials.

TABELA 3. Wyniki badań potencjodynamicznych – wartości średnie. TABLE 3. Results of potentiodynamic tests – mean values.

S	posób przygotowania		Ti (Grade 4)						
	próbki Sample preparation	E _{corr} mV	Odch. stand. St. deviation	R _p kΩ·cm²	Odch. stand. St. deviation	i _{corr} µA/cm²	Odch. stand. St. deviation		
0	Ti_stan wyjściowy Ti_initial state	-259	±28.9	155	±122.2	0.160	±0.014		
1	Ti_40	-127	±26.8	786	±49.5	0.033	±0.008		
2	Ti_50	-151	±20.1	1064	±333.4	0.024	±0.004		
3	Ti_60	-246	±21.2	1645	±643.5	0.015	±0.002		
4	Ti_70	-208	±52.3	1845	±275.7	0.014	±0.003		
5	Ti_80	-172	±52.1	1559	±133.5	0.016	±0.005		
6	Ti_90	-174	±32.5	2101	±1780	0.012	±0.003		
7	Ti_100	-235	±61.2	4020	±1088.9	0,006	±0.001		

BI MATERIAG

Na podstawie uzyskanych wartości kątów zwilżania można stwierdzić, że wszystkie analizowane powierzchnie są hydrofilowe. Największą zwilżalnością charakteryzuje się powierzchnia próbki poddanej utlenianiu anodowemu przy zastosowaniu napięcia 40 V, natomiast największe wartości kąta zwilżania, a tym samym zmniejszenie zwilżalności obserwuje się dla próbek poddanych procesowi utleniania anodowego przy napięciu 80 V oraz 100 V.

Wyniki badań odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną przedstawiono na RYS. 2 oraz w TABELI 3. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że potencjał korozyjny dla próbek w stanie wyjściowym (szlifowanie oraz polerowanie elektrolityczne) przyjmował średnią wartość E_{corr} = -259 mV. Wyznaczone krzywe polaryzacji anodowej wskazywały na istnienie zakresu pasywnego do wartości potencjału E = +4000 mV. W tym przypadku nie zaobserwowano gwałtownego przyrostu gęstości prądu anodowego w analizowanym zakresie pomiarowym, świadczącego o zainicjowaniu procesu korozji wżerowej. Dla próbek w stanie wyjściowym wyznaczona średnia wartość oporu polaryzacyjnego wynosiła R_{p} = 155 k Ω cm². W dalszej kolejności badaniu poddano próbki utleniane anodowo. Stwierdzono korzystne zwiększenie się wartości potencjału korozyjnego Ecorr oraz zwiększenie oporu polaryzacyjnego R_p w odniesieniu do próbek w stanie wyjściowym. W tym przypadku zakres pasywny również występował w całym zakresie anodowym. Ponadto stwierdzono korzystne zmniejszenie gęstości prądów w zakresie anodowym dla próbek po modyfikacji powierzchni w stosunku do materiału wyjściowego co świadczy o zwiększeniu odporności korozyjnej badanego biomateriału po jego obróbce (TABELA3). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że najkorzystniejszym wariantem jest zastosowanie utleniania przy potenciale 100 V.

W ostatnim etapie pracy przeprowadzono badania z wykorzystaniem EIS. Wyniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej w postaci widm impedancyjnych uzyskane w celu zidentyfikowania charakteru wytworzonej warstwy tlenkowej na powierzchni biomateriału przedstawiono na RYS. 3. Natomiast uzyskane wielkości elektryczne wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm zestawiono w TABELI 4. On the base of obtained values of wetting angles one may state that all tested surfaces are hydrophilic. The sample subjected to anodic oxidation at 40 V is characterised by the highest wettability. The highest values of wetting angle, and thus decrease in wettability, is noted for samples subjected to anodic oxidation by voltages at the level of 80 V and 100 V.

Results of research of pitting corrosion resistance according to the potentiodynamic method are presented in FIG. 2 and in TABLE 3. It has been stated that corrosion potential for samples in their initial condition (grinding and electrolytic polishing) amounted to a mean value $E_{corr} = -259$ mV. Anodic polarisation curves determined in such a way indicate the existence of a passive range to the value of potential E = +4000 mV. In this case no violent increase in anode current density was noticed in the analysed range, which might provide for initiating the pitting corrosion process. In the case of samples at their initial condition the mean value of polarisation resistance was determined and amounted to $R_{o} = 155 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$. Next anodic oxidised samples were subjected to research. Positive increase in the value of corrosive potential E_{corr} and an increase in polarisation resistance R_n was observed in comparison to the samples in the initial state. In this case, the passive range was found in the entire anodic range. In addition, positive reduction of the current density was observed in the anodic range for the samples following surface modification is comparison to the initial material, which indicates increased corrosive resistance of the tested biomaterial after treatment (TABLE 3). On the basis of the above research it has been stated that the most advantageous variant is the application of oxidation by the potential of 100 V.

Research with the use of EIS was carried out at the last stage. Results of electrochemical impedance spectroscopy having the form of impedance spectra obtained to identify the character of the created oxide layer on the biomaterial surface are shown in FIG. 3. The obtained electric values determined on the basis of registered spectra are shown in TABLE 4.



RYS. 3. Przykładowe widma impedancyjne dla próbek w stanie wyjściowym oraz poddanych modyfikacji powierzchni: a) wykres Nyquista, b) diagram Bode.

FIG. 3. Sample impedance spectra for samples at the initial condition and after they have been subjected to surface modification: a) Nyquist graph, b) Bode's diagram.

TABELA 4. Wyniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej dla próbek w stanie wyjściowym oraz po utlenianiu anodowym przy napięciu od 40 V do 100 V.

TABLE 4. Results of electrochemical impedance spectroscopy for samples at the initial condition and after they have been subjected to anodic oxidation from 40 V to 100 V.

Materiał		R			P			۱۸/	F
Material	R_s , Ωcm^2	kΩcm²	Y ₀₂ , Fs ⁿ⁻¹ /cm ²	n	kΩcm²	Y ₀₁ , Fs ⁿ⁻¹ /cm²	n	μΩ	mV
Ti_stan wyjściowy Ti_initial state	17	30	0.1454E-4	0.89	203	0.3783E-2	0.33	-	-244
Ti_40	16	-	-	-	223	0.4702E-6	0.90	8	-116
Ti_50	17	-	-	-	209	0.4196E-6	0.88	5	-127
Ti_60	15	-	-	-	469	0.2603E-6	0.90	3	-110
Ti_70	17	-	-	-	524	0.2311E-6	0.89	5	-193
Ti_80	17	-	-	-	956	0.2270E-6	0.88	4	-203
Ti_90	17	-	-	-	1329	0.1734E-6	0.89	2	-170
Ti_100	17	968	0.2083E-6	0.89	4260	0.1852E-5	0.81	-	-100



RYS. 4. Elektryczne schematy zastępcze wyznaczone dla cpTi: a) Ti_40, Ti_50, Ti_60, Ti_70, Ti_80, Ti_90, b) Ti_stan wyjściowy, Ti_100V.

FIG. 4. Electric substitute schemes for cpTi: a) Ti_40, Ti_50, Ti_60, Ti_70, Ti_80, Ti_90, b) Ti_initial state, Ti_100V.

Najlepsze dopasowanie modelowych widm do widm impedancyjnych wyznaczonych eksperymentalnie w sztucznym osoczu zapewnia: obwód zastępczy o jednej stałej czasowej składający się z czterech elementów elektrycznych reprezentujących opór elektrolitu i przejścia jonów, pojemność warstwy oraz zjawiska dyfuzyjne w warstwie (RYS. 4a), a także układ elektryczny, który wskazuje na udział warstwy podwójnej (RYS. 4b) [9,12-14]. Błąd dopasowania wynosił od 2 do 6%. Symbole opisujące poszczególne elementy elektrycznych obwodów zastępczych oznaczają odpowiednio: R_s - rezystancja elektrolitu, CPE_{dl} pojemność warstwy podwójnej, R_{ct} – opór przeniesienia ładunku na granicy faz, CPE_{pore} – pojemność warstwy porowatej, R_{pore} - opór roztworu w strefie warstwy porowatej (obecność porów, efekt relaksacji lub dyfuzji wewnątrz tych porów), W – element Warburga. Diagramy Nyquista wyznaczone dla próbek z tytanu cpTi poddanego polerowaniu elektrolitycznemu i utlenianiu anodowemu przy różnych wartościach potencjału przedstawiają fragmenty dużych niepełnych półokręgów, które są typową odpowiedzią impedancyjną dla cienkich warstw tlenkowych (RYS. 3a). Przedstawione na diagramach Bode (RYS. 3b), maksymalne wartości kątów przesunięcia fazowego w szerokim zakresie częstotliwości, niezależnie od rodzaju próbki, są zbliżone i wynoszą $\theta \approx 85^{\circ}$. Nachylenia log|Z| w całym zakresie zmian częstotliwości są bliskie -1, co świadczy o pojemnościowym charakterze warstwy tlenkowej.

The best matching of model spectra to experimental impedance spectra in the artificial plasma was assured by a substitute circuit with a single time constant composed of four electric elements representing electrolyte resistance and ions transition, the layer capacity as well as diffusion phenomena inside layer (FIG. 4a), as well as another electric circuit that indicates the input of the double layer (FIG. 4b) [9,12-14]. The error in fitting procedure was from 2 to 6%. Symbols describing individual elements of electric substitute circuits are marked respectively: R_s – electrolyte resistance, CPE_{dl} – capacity of the double layer, R_{ct} – resistance of the charge transition at phases border, CPEpore - capacity of porous layer, R_{pore} - resistance of solution in the porous layer sphere (presence of pores, relaxation or diffusion effect within the pores), W - Warburg's element. Nyquist diagrams set for cpTi titanium samples formerly subjected to electrolytic polishing and anodic oxidation by different values of the values of potential have the form of fragments of large, incomplete semicircles that have impedance response typical for thin oxide layers (FIG. 3a). Maximum values of phase displacement at a broad range of frequencies presented in Bode's diagrams (FIG. 3b) are similar regardless of the type of sample, and amount to $\theta \approx 85^{\circ}$. The slope log|Z| at the whole scope of frequency change are close to -1 which indicates the capacity character of oxide layer. Z kolei duże wartości impedancji $|Z| > 10^{6} \Omega \cdot cm^{2}$ w zakresie najmniejszych częstotliwości w przypadku próbek poddanych utlenianiu przy potencjale 90 V i 100 V wskazują na dobre właściwości dielektryczne i ochronne warstw anodowych powstałych na powierzchni próbek.

Wyznaczone wartości admitancji (Z⁻¹) oraz współczynnika *n* dla próbek poddanych procesowi utleniania anodowego przy różnych wartościach napięcia wykazały poprawę własności ochronnych w stosunku do stanu wyjściowego bezpośrednio po polerowaniu elektrochemicznym. Ponadto utlenianie anodowe przy napięciu 100 V spowodowało znaczący wzrost wartości oporu przejścia jonów na granicy faz R_{ct} oraz wyeliminowanie zjawisk dyfuzyjnych powstałych w wyniku bezpośredniego oddziaływania sztucznego osocza.

Wnioski

Poprawa hemokompatybilności implantów wykonanych z tytanu stanowi źródło zainteresowań wielu jednostek badawczych. Dotychczasowe obserwacje kliniczne wykazały, że struktura i grubość warstwy powierzchniowej mają decydujący wpływ na jakość finalną implantów. Istnieje wiele sposób jej kształtowania. Skład chemiczny i struktura warstwy może być kształtowana przy użyciu metod elektrochemicznych, wśród których dominuje utlenianie anodowe. Aktualnie zagadnieniom utleniania anodowego poświęconych jest wiele prac, które swą uwagę skupiają między innymi na własnościach fizykochemicznych powierzchni implantów dostosowanych do układu kostnego [15,16]. Niewiele miejsca literatura poświęca zagadnieniom związanym z modyfikacją powierzchni tytanu do kontaktu z krwią. Stąd też autorzy pracy podjęli próbę oceny przydatności utleniania anodowego powierzchni tytanu grade 4 na implanty stosowane w układzie krwionośnym. W pierwszym etapie pracy powierzchnie próbek utlenianych anodowo w zakresie potencjałów 40 V - 100 V poddano ocenie zwilżalności. Analiza charakteru warstwy powierzchniowej biomateriału pod względem zwilżalności pozwala na ocenę, między innymi zachowania komórek. Większa zwilżalność, a więc mniejszy kąt zwilżania będzie sprzyjała adhezji komórek do powierzchni biomateriału, co jest ważne w przypadku implantów ortopedycznych, gdyż wpływa na proces integracji implantu z tkanką. Natomiast mniejsza zwilżalność - większa wartość kąta zwilżania, jest istotna w przypadku takich klinicznych zastosowań, jak np. elementy zastawek serca czy urządzenia służące do dializy, dla których pożądana jest mała adsorpcja białek, która ogranicza proces krzepnięcia krwi [17-19]. W badaniu wykazano, że maksymalna wartość potencjału utleniania (100 V) pozwala na uzyskanie kąta zwilżania wskazującego na małą zwilżalność powierzchni, co jest zjawiskiem korzystnym dla implantów do kontaktu z krwią [1,2]. Oprócz zjawiska zwilżalności powierzchni istotnym kryterium przydatności danego rodzaju modyfikacji powierzchni w przypadku implantów kardiologicznych jest odporność korozyjna. Dlatego też w kolejnym etapie pracy przeprowadzono badania elektrochemiczne. Niezależnie od wartości potencjału utleniania anodowego stwierdzono całkowitą odporność na korozję wżerową w zakresie do +4 V oraz korzystne zwiększenie wartości oporu polaryzacyjnego, a co za tym idzie obniżenie gęstości prądu korozyjnego. Wytworzona w ten sposób warstwa podwójna zidentyfikowana w badaniach EIS stanowiła barierę ochronną przed odziaływaniem środowiska korozyjnego. Wysoka wartość oporu przejścia jonów uzyskana przy 100 V i brak elementu Warburga wpływa na duża stabilność warstwy i brak reakcji w kontakcie ze sztucznym osoczem, co należy uznać za korzystne.

On the other hand, high values of impedance $|Z| > 10^6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ at the lowest frequency range in the case of samples that have been oxidized at the voltage of 90 V and 100 V indicate good dielectric and protective properties of anode layers occurring on samples surfaces.

Set admittance (Z⁻¹) values and *n* coefficient for samples subjected to anodic oxidation by different values of voltages have demonstrated the improvement in protective properties compared to the initial state directly after electrochemical polishing. Furthermore, anodic oxidation by the voltage of 100 V caused a significant increase in the ions transition resistance value at interface R_{ct} and the elimination of diffusion phenomena occurring as a result of the direct influence of artificial plasma.

Conclusions

Improvement of haemocompatibility of titanium implants is of much interest for many research entities. Previous clinical observations demonstrated that structure and thickness of the surface layer determine the final quality of implants. There are various ways to shape it. Chemical composition and structure of the layer may be modelled using electrochemical methods, of which anodic oxidation is a dominant one. Presently, many studies are devoted to the issue of anodic oxidation, focusing also on physicochemical characteristics of the surface of implants adjusted to the skeletal system [15,16]. Few studies are available in the literature regarding issues associated with modification of titanium surface in contact with blood. Therefore, the authors attempted to evaluate the usefulness of anodic oxidation of Grade 4 titanium surface for implants used in the blood system. In the first stage of the study, wettability of surfaces of the samples undergoing anodic oxidation in the range of 40 V - 100 V was assessed. The analyse of biomaterial surface layer regarding their wettability allowes to evaluate possible reaction of cells. Higher wettability and thus lower wetting angle shall favour cell adhesion to biomaterial surface what is important in the case of orthopaedic implants as it influences the process of tissue - implant integration. On the other hand, lower wettability - higher value of wetting angle is vital in the case of such clinical applications as eg. elements of cardiac valves or devices used in dialysis in which case the lowest protein adsorption is desired as it reduces blood coagulation [17-19]. The test demonstrated that maximum value of the oxidation potential (100 V) allows to obtain a wettability angle indicating low surface wettability, which is a positive phenomenon for implants in contact with blood [1,2]. Apart from wettability, an important usefulness criterion for a given type of surface modification in the case of cardiovascular implants is corrosive resistance. Therefore, electrochemical testing was conducted in the next stage of the study. Regardless of the value of anodic oxidation potential, complete resistance to pitting corrosion was observed within the range of up to +4000 mV, as well as a positive increase in polarisation resistance and, consequently, a reduction in the corrosive current density. Thus created double layer identified in the EIS tests was a protective barrier against the effects of corrosive environment. High value of the ionic transfer resistance achieved with 100 V variant and absence of the Warburg element provide high stability of the layer, as well as lack of reactions in contact with artificial blood plasma, which should be considered as a positive effect.

Reasumując, na podstawie przeprowadzonych pomiarów zwilżalności powierzchni, badań potencjodynamicznych i impedancyjnych jednoznacznie wykazano, że zastosowanie procesu utleniania anodowego przy wartości potencjału 100 V po procesie polerowania elektrochemicznego dla tytanu cpTi Grade 4 stosowanego na implanty kardiologiczne jest uzasadnione i w pełni przydatne dla poprawy bezpieczeństwa użytkowania wszczepu.

W celu pełniejszego scharakteryzowania powierzchni czystego tytanu ctTi Grade 4 poddanego utlenianiu anodowemu przy wartości napięcia 100 V w kolejnych badaniach przeprowadzona zostanie analiza trombogenności powierzchni metodą Impact-R.

Podziękowania

Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr 2011/03/B/ST8/06499.

Piśmiennictwo

[1] Nair K., Muraleedharan C.V., Bhuvaneshwar G.S.: Developments in mechanical heart valve prosthesis. SADHANA – Academy Proceedings in Engineering Sciences 28 (2003) 575-587.

[2] Kostrzewa B., Rybak Z.: Rys historyczny, teraźniejszość i przyszłość biomateriałów wykorzystywanych w sztucznych zastawkach serca. Polim. Med., 43(3) (2013) 183-189.

[3] Krasicka-Cydzik E.: Formowanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego implantowanych stopach w środowisku kwasu fosforowego. Monografia, Zielona Góra, 2003

[4] Krasicka-Cydzik E., Głazowska J.: Elektrochemiczna metoda formowania bioaktywnych warstw na Ti i jego stopach, Spondyloimplantologia zaawansowanego leczenia kręgosłupa systemem DERO, Zielona Góra (2005) 115-121.

[5] Krauze A., Kajzer W., Dzielicki J., Marciniak J.: Influence of mechanical damage on corrosion resistance of plates used in funnel chest treatment. Journal of Medical Informatics & Technologies 10 (2006) 133-141.

[6] Kajzer W., Krauze A., Walke W., Marciniak J.: Corrosion behavior of AISI 316L steel in artificial body fluids. Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering 31(2) (2008) 247-253.
[7] Kajzer A., Ordon J.: Surface Damage of Intramedullary Nails Used In Veterinary. Engineering of Biomaterials 96-98 (2010) 49-53.
[8] Kajzer W., Kajzer A.: Badania potencjodynamiczne i impedancyjne implantów do leczenia zniekształceń przedniej ściany klatki piersiowej. Przegląd Elektrotechniczny 12 (2013) 275-279.

[9] Kiel-Jamrozik M., Szewczenko J., Walke W., Marciniak J.: Zastosowanie EIS do oceny własności fizykochemicznych modyfikowanego powierzchniowo stopu Ti-6AI-4V ELI. Przegląd Elektrotechniczny 12b (2012) 232-235.

[10] Basiaga M., Walke W., Paszenda Z., Karasiński P.: Research on electrochemical properties SiO_2 layer, intended for contact with blood, deposited by sol-gel method. European Cells and Materials 26(6) (2013) 157.

.

On the base of measurements of surface wettability, potentiodynamic and impedance tests it has been explicitly demonstrated that the application of anodic oxidation process at 100 V after the process of electrochemical polishing for pure cpTi Grade 4 titanium being used to make cardiological implants is wellgrounded and fully useful for improvement safe implant usage.

In order to better characterize the surface of pure ctTi Grade 4 titanium subjected to anodic oxidation by voltage of 100 V an analyse of thrombogenic properties of surfaces with the application of Impact-R method shall be carried out.

Acknowledgments

The project was funded by the National Science Centre allocated on the basis of the decision No. 2011/03/B/ ST8/06499.

References

[11] ASTM F2129 - Electrochemical Corrosion Testing of Surgical Implants (Standard Test Method for Conducting Cyclic Potentiodynamic Polarization Measurements to Determine the Corrosion Susceptibility of Small Implant Devices).

[12] Alves V.A., Reis R.Q., Santos I.C.B., Souza D.G., Goncalves T. de F., Pereira-da-Silva M.A., Rossi A., da Silva L.A.: In situ impedance spectroscopy study of the electrochemical corrosion of Ti and Ti-6Al-4V in simulated body fluid at 25°C and 37°C. Corrosion Science 51 (2009) 2473-2482.

[13] Walke W., Przondziono J.: Zastosowanie EIS do oceny własności fizykochemicznych drutów stosowanych na prowadniki kardiologiczne. Przegląd Elektrotechniczny 12b (2012) 144-147.

[14] Souza M.E.P., Ballester M., Freire C.M.A.: EIS characterisation of Ti anodic oxide porous films formed using modulated potential. Surface & Coatings Technology 201 (2007) 7775-7780.

[15] Szewczenko J., Jaglarz J., Kurzyk J., Paszenda Z.: Optical methods applied in thickness and topography testing of passive layers on implantable titanium alloys. Optica Applicata 43 (2013) 173-180.

[16] Szewczenko J., Paszenda Z., Marciniak J.: Influence of surface modification on corrosion resistance of Ti-6AI-7Nb alloy. Engineering of Biomaterials 106-108 (2011) 140-144.

[17] Liber-Kneć A., Łagan S.: Zastosowanie pomiarów kąta zwilżania i swobodnej energii powierzchniowej do charakterystyki powierzchni polimerów wykorzystywanych w medycynie. Polim. Med. 44 (2014) 29-37.

[18] Kaczmarek H., Bajer K.: Metody badania biodegradacji materiałów polimerowych. Polimery 51(10) (2006) 716-721.

[19] Kim M.S., Khang G., Lee H.B.: Gradient polymer surfaces for biomedical applications. Progress Polym. Sci. 33(1) (2008) 138-164.

SYNTEZA I CHARAKTERYSTYKA HYDROŻELOWYCH NANO-KOMPOZYTÓW CHITOZAN/ LAPONIT DLA INŻYNIERII TKANKI KOSTNEJ

Krzysztof Pazdan*, Kinga Pielichowska*, Karol Gryń, Jan Chłopek

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków * e-mail: kpazdan@agh.edu.pl, kingapie@agh.edu.pl

Streszczenie

Celem przeprowadzonych badań było uzyskanie nowego wielofunkcyjnego biomateriału do regeneracji tkanki kostnej, spełniającego wymagania stawiane przez nowe trendy w medycynie regeneracyjnej. Biorąc pod uwagę wymagania związane ze zgodnością biologiczną oraz minimalną szkodliwością implantu dla organizmu ludzkiego, z grupy dostępnych naturalnych i syntetycznych polimerów jako najbardziej obiecujący wybrany został chitozan. Chitozan jest coraz częściej używanym polimerem w zastosowaniach medycznych, takich jak: opatrunki, systemy dostarczania leku, system dostarczania genów, podłoża do regeneracji kości i tkanek miękkich, itp. Istotną zaletą chitozanu jest jego zdolność do tworzenia fazy hydrożelowej i ta właściwość jest wykorzystywana przez naukowców do uzyskiwania nowych biomateriałów. Obecnie hydrożele są używane w zastosowaniach sensorycznych wykorzystujących sygnały temperaturowe, pH, siły jonowej, jonowe czy przyłożonego zewnętrznego pola magnetycznego do wywołania oczekiwanej odpowiedzi. W niniejszej pracy został zastosowany syntetyczny nanokrzemian warstwowy pod nazwą handlową Laponite[®] XLS zamiast powszechnie stosowanych organicznych środków sieciujących często szkodliwych dla pacjenta. Uzyskane próbki zostały scharakteryzowane za pomocą różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC), spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), dyfrakcji rentgenowskiej oraz testu nasiakliwości. Do wstępnego określenia bioaktywności materiałów zastosowano test w warunkach in vitro zaproponowany przez Kokubo. Uzyskane dane poddane ocenie i szczegółowej analizie dały pozytywne i obiecujące wyniki.

Słowa kluczowe: chitozan, Laponite[®], rusztowanie, regeneracja tkanki kostnej

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 31-39]

Wstęp

W dzisiejszych czasach, kiedy wypadki i choroby są odpowiedzialne za niemal wszystkie uszkodzenia tkanki kostnej, zadaniem inżynierii materiałowej jest otrzymanie odpowiedniego biomateriału wspomagającego jej rekonstrukcję. Kość jest wielofazowym kompozytem składającym się z zewnętrznej fazy - zbitej tkanki kostnej, oraz wewnętrznej fazy - gąbczastej tkanki kostnej.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HYDROGEL CHITOSAN/LAPONITE NANOCOMPOSITES FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Krzysztof Pazdan*, Kinga Pielichowska*, Karol Gryń, Jan Chłopek

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

Abstract

The aim of the study was to obtain novel multifunctional biomaterials for bone tissue regeneration fulfilling the requirements imposed by new trends in regenerative medicine. Taking into account that implant has to be biocompatible and less harmful to humans, from a group of available natural and synthetic polymers chitosan was chosen as one of the most promising biomaterials. Chitosan is more and more commonly used in medicine for wound dressings, drug delivery systems, gene delivery systems, scaffolds for bone and soft tissue regeneration etc. Important advantage of chitosan is its ability to create hydrogel phases and this property is used by scientists to obtain novel biomaterials. Nowadays hydrogels are commonly used in sensing applications using temperature, pH, ions, ionic strength or external magnetic field mechanisms to trigger the desired response. Having regarded patient care, synthetic nanoclay (trade name Laponite® XLS) was applied instead of commonly used organic cross--linkers. Obtained specimens were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction and water soaking test. The in vitro test proposed by Kokubo was performed to determine bioactivity of the materials. Obtained data were analyzed in detail and provided positive and promising information.

Keywords: chitosan, Laponite[®], scaffold, bone tissue regeneration

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 31-39]

Introduction

Nowadays, when accidents and diseases are responsible for almost all bone tissue damages, materials engineering is going forward to accomplish requirements for bone replacement biomaterials. According to materials engineering bone is a multiphase composite combined form exterior compact osseous tissue and interior spongy osseous tissue. These biologically identical tissues are very different in their microstructure, which influences their functions. When compact tissue provides mechanical properties like stiffness and elasticity, spongy tissue, owing to its porous structure, ensures transport of biological fluids [1]. Te biologicznie identyczne tkanki bardzo różnią się budową mikrostrukturalną, co powoduje zróżnicowanie ich funkcji. Istota zbita zapewnia właściwości mechaniczne, takie jak sztywność i sprężystość, natomiast istota gąbczasta, dzięki porowatej strukturze, zapewnia możliwość transportu płynów biologicznych [1].

Materiały na podłoża dla regeneracji tkanki kostnej powinny być: bioaktywne i biozgodne, bioresorbowalne, nietoksyczne (zarówno sam materiał jak i produkty degradacji), łatwo formowalne i stosunkowo proste w otrzymywaniu [2]. Są to powody, dla których klasycznie stosowane materiały poddaje się modyfikacji w celu poprawienia ich bioaktywności, zwilżalności, wytrzymałości mechanicznej oraz stabilności termicznej i chemicznej [3,4]. Niektóre z biomateriałów wykazują część parametrów adekwatnych do planowanych zastosowań, co ułatwia ich modyfikację, a przykładem jest chitozan. Obecnie powszechnie stosowane hydrożele są trójwymiarowymi hydrofilowymi sieciami polimerowymi, których właściwości zależą od środowiska zewnętrznego. Najbardziej popularnymi i poszukiwanymi przez badaczy materiałami są te, które reagują zmianą objętości w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, takie jak pH, temperatura, siła jonowa i pole elektryczne lub magnetyczne [5].

Chitozan jest polisacharydem pochodzenia naturalnego uzyskiwanym poprzez alkaliczną deacetylację proszku chityny otrzymywanej ze skorupek bezkręgowców (np. krewetek). Chtozan o wysokiej czystości można także otrzymać w wyniku hodowli specyficznych gatunków grzybów [6]. Kohn i in. w swojej pracy przedstawili najczęściej używane biodegradowalne polimery stosowane do produkcji materiałów dla potrzeb inżynierii tkankowej, a wśród nich chitozan, który posiada zestaw niezbędnych właściwości wymaganych dla przyszłych zastosowań w tej dziedzinie [7]. Według Malette i in. implanty na bazie chitozanu są dobrze tolerowane i nieantygenowe w porównaniu z materiałami z modnego obecnie kwasu hialuronowego [8]. Dodatkowo można z niego w prosty sposób tworzyć porowate hydrożele i hydrożelowe nanokompozyty. Nowe struktury hydrożelowe można uzyskać na kilka różnych sposobów, m.in. poprzez zamykanie biomolekuł, jako systemy dostarczania leków, genów czy układy teranostyczne. Do chitozanowej matrycy oraz jego kompozytów wprowadza się liczne środki terapeutyczne, na przykład: antybiotyki, leki przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, steroidy, białka, aminokwasy, związki przeciwcukrzycowe i diuretyki [9,10].

Głównymi zaletami chitozanu wyróżniającymi go w grupie potencjalnych materiałów na rusztowania są: nietoksyczność, nieimmunogenność, brak rakotwórczości produktów degradacji, biokompatybilność, bioaktywność, bioresorbowalność oraz biodegradowalność [11]. Właściwości te czynia chitozan potencjalnym kandydatem na nowoczesne hydrożelowe systemy dostarczania leków. Według Buengera i in. chitozan łatwo tworzy struktury hydrożelowe oraz posiada zdolność magazynowania biocząsteczek poprzez wiele mechanizmów, w tym sieciowanie chemiczne, sieciowanie jonowe i jonowe kompleksowanie [12]. Możliwe zmiany struktury chitozanu przez modyfikację chemiczną również okazują się użyteczne w kwestii magazynowania biologicznie aktywnych cząsteczek przez strukturę polimeru i kontroli profilu ich uwalniania. Istnieje kilka typowych metod modyfikacji, takich jak: kopolimeryzacja, szczepienie, chemiczne i jonowe sieciowanie, tworzenie polielektrolitowych kompleksów, itp. [13]. Badania wykazały, że chitozan może promować proliferację komórek i osteogenezę, ale tylko w przypadku stosowania kompozytów umiarkowanie pęczniejących. Zbyt wysoka zdolność magazynowania wody nie jest zalecana [10]. Istnieje zatem wiele bardzo korzystnych właściwości chitozanu, które mogą być przydatne dla przyszłych zastosowań.

Materials for scaffolds for bone tissue regeneration have to be bioactive, biocompatible, bioresorbable, non-toxic (material and products of degradation), easily formable, easily processable [2]. The main reason why classically used materials are modified are the needs to improve their bioactivity, wettability, mechanical strength and thermal or chemical properties [3,4]. Currently commonly used hydrogels are hydrophilic three-dimension polymer networks, which react to the signals from surrounding environment. The most popular and prospective for researchers are these undergoing a volume change in response to external stimuli such as pH, temperature, ionic strength, electric and magnetic field [5].

Chitosan is a natural-based polysaccharide obtained by alkaline deacetylation of chitin powder received from invertebrates (e.g. shrimps). High purity chitosan can be also obtained from fungus culture [6]. Kohn et al. presented the most commonly used biodegradable polymers in tissue-engineered products. Among them, chitosan has a set of required properties for future applications [7]. Advantages of chitosan as biomedical implant for bone tissue regeneration are indisputable. According to Malette et al. chitosan implants are well-tolerated and non-antigenic as compared to fashionable hyaluronic acid materials [8]. It can easily create porous hydrogels and hydrogel based nanocomposites. However novel hydrogel structures can be obtained through several ways of entrapment of biomolecules for different applications, e.g. drug delivery, gene delivery and theranostics. In chitosan-based matrix and composites numerous therapeutic agents have been incorporated, such as: anticancer, antibiotics, antithrombotic, anti-inflammatory, steroids, proteins, amino acids, antidiabetic and diuretics [9,10].

Main advantages of chitosan as potential scaffold materials are non-toxicity, non-immunogenicity, non-carcinogenicity of degradation products, biocompatibility, bioactivity, bioresorbability and biodegradability [11]. These properties make it a future candidate for novel hydrogel drug delivery systems. According to Buenger et al. chitosan easily forms hydrogel particles and entraps biomolecules through a number of mechanisms, including chemical crosslinking, ionic crosslinking, and ionic complexation [12]. A possible alternative for chitosan is its chemical modification found useful for the association of bioactive molecules and then controlling their release profile. There are a few universal methods of modification such as copolymerization, grafting, chemical and ionic crosslinking, polyelectrolyte complexation, etc [13]. Previous studies demonstrated that chitosan could promote cell proliferation and osteogenesis but only in the case of moderate swelling materials. Too high ability of water entrapment is not recommended [10]. There are multiple advantageous properties of chitosan that can be useful for future applications.

Cross-linking is the most common way for improvement of hydrogel properties. In the case of chitosan Tapan Kumar Giri *et al.* listed substances used as crosslinkers such as glutaraldehyde, oxalic acid, formaldehyde, glyoxal and genipine [14]. These are organics which mostly are harmful or poisonous. Therefore Laponite[®] was chosen as harmless to humans.

Laponite[®] is a plate-like synthetic clay hectorite-type belonging to a family of phyllosilicates type 2:1. Its structure represent empirical formula: $Na^{0.7+}[Si_8Mg_{5.5}Li_{0.3}O_{20}$ (OH)₄]^{0.7-}. The plates of Laponite[®] are of 25 nm in length and 0.92 nm in thickness [15]. Laponite[®] has multiple strong advantages like large surface area, anionic surface charges and exchangeable sodium cations in hydrated interlayers.

GINERING OF MATERIALS

ш

Sieciowanie jest najczęstszym sposobem poprawy właściwości fazy hydrożelowej. W przypadku chitozanu Tapan Giri Kumar i in. jako najczęściej stosowane środki sieciujące wyszczególnili takie substancje jak: aldehyd glutarowy, kwas szczawiowy, formaldehyd, glioksal i genipin [14]. Są to substancje organiczne, które w większości są szkodliwe lub toksyczne dla organizmu ludzkiego. Dlatego w niniejszej pracy jako środek sieciujący wybrano nieszkodliwy dla organizmu ludzkiego Laponite[®].

Laponite® jest syntetycznym krzemianem warstwowym typu hektorytu o budowie płytkowej należącą do rodziny krzemianów warstwowych typu 2:1. Jego strukturę opisuje wzór empiryczny: Na^{0.7+}[Si₈Mg_{5.5}Li_{0.3}O₂₀(OH)₄]^{0.7-}. Płytki Laponitu® mają 25 nm długości i 0,92 nm grubości [15]. Laponite® ma wiele zalet, takich jak: duża powierzchnia właściwa, ujemny ładunek powierzchniowy i wymienne kationy sodu w uwodnionych warstwach międzypakietowych. Obecność kationów sodu powoduje lepsze właściwości adsorpcyjne dla leków o budowie kationowej. Ponadto jego eksfoliowane cząstki mogą działać jako wielofunkcyjne środki sieciujące tworząc wiązanie między łańcuchami polimeru a czasteczkami dając w konsekwencji trójwymiarowa sieć [16]. Zastosowanie Laponitu® jako środka sieciującego zamiast klasycznie używanych substancji organicznych, wydaje się korzystne ze względu na jego nietoksyczne właściwości dla żywych komórek oraz całego organizmu [17]. Użyty syntetyczny krzemian warstwowy charakteryzuje się identyczną budową, lecz lepszymi właściwościami sorpcyjnymi niż montmorylonit. Jako syntetyczny związek wykazuje on bardzo niską zawartość metali ciężkich. Ponadto Laponit® pod względem składu chemicznego i produktów rozpuszczania wykazuje pewne podobieństwo do bioaktywnych szkieł, jak również wykazuje zdolność do tworzenia bioaktywnych nanokompozytów PEO/Laponit® [18,19]. Poprzez analogię do innego podobnego krzemianu warstwowego (montmorylonitu), z którego można otrzymać bioaktywne kompozyty chitozanu [20] można spodziewać się, że wprowadzenie Laponitu[®] do chitozanu również pozwoli na poprawę bioaktywności otrzymywanych materiałów.

W niniejszej pracy przedstawiono badania nad nowymi hydrożelowymi nanokompozytami na bazie chitozanu dla inżynierii tkanki kostnej, które zostały uzyskane przez sieciowanie chitozanu przy użyciu Laponitu[®].

Materiały i metody

Przygotowanie kompozytów

Chitozan (MCS) otrzymany z pancerzyków krewetek o średniej masie cząsteczkowej 600.000 - 800.000 i stopniu deacetylacji 75-85% oraz tripolifosforan sodu (TPP) o wzorze empirycznym $Na_5O_{10}P_3$ wyprodukowała firma Acros Organics. Do rozpuszczania chitozanu użyto kwasu octowego (CH₃COOH) produkcji POCH SA (Polska). Wybrany typ Laponite[®] XLS dostępny na rynku został dostarczony przez Rockwood Additives Ltd (UK).

Wszystkie syntezy przeprowadzono w tych samych warunkach temperatury pokojowej w atmosferze powietrza. Odważone ilości Laponitu[®] XLS zdyspergowano w 2% (% wag.) wodnym roztworze kwasu octowego i mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego przez czas zalecany przez producenta [15] (w przypadku Laponite[®] XLS około 1 godziny). Następnie, ostrożnie dodano odpowiednie ilości chitozanu i mieszano przez następną godzinę w celu rozpuszczenia polimeru. Wszystkie próbki hydrożelu charakteryzowały się tą samą zawartością chitozanu (MCS) - 2,5% (% wag.) i różną zawartością Laponite[®] (XLS) - TABELA 1. Presence of sodium cations causes better adsorption properties for cationic drug molecules. Moreover, the exfoliated particles may act as multifunctional cross-linkers in the nanocomposite hydrogel formation and the polymer chains were anchored to the particles and entangled to form a network [16]. Use of Laponite® as a cross-linker is an appropriate approach instead of classicaly used organics, due to its nontoxic properties for living cells and whole organism [17]. Additionally Laponite® exhibits some similarity to bioactive glasses, in terms of chemical composition and dissolution products and it demonstrates the ability of creating bioactive PEO/Laponite® nanocomposites [18,19]. Used synthetic clay has got the same structure type but better sorption properties than montmorillonite. As a synthetic compound it shows low heavy metal content. Referring to another bioactive clay commonly used for obtaining biocomposites -montmorillonite [20], it might be expected that introduction of Laponite® to chitosan matrix will improve bioactivity of the resulting material.

In this work the results on novel nanocomposites based on chitosan hydrogels for bone tissue that have been obtained by chitosan crosslinking using Laponite[®] are reported.

Materials and Methods

Preparation of composites

Chitosan (MCS) from shrimp shells (medium molecular weight: 600,000 - 800,000, deacetylation degree between 75% and 85%) and sodium tripolyphosphate (TPP) with empirical formula Na₅O₁₀P₃ were purchased from Acros Organics. Acetic acid (CH₃COOH) used to dissolve chitosan was purchased from POCh (Poland). Laponite[®] was supplied by Rockwood Additives Ltd (UK).

All reactions were performed in the same room conditions and air atmosphere. Weighed amounts of Laponite[®] XLS were dispersed in 2% (wt%) acetic acid aqua solution and mixed with magnetic stirrer during time specified by producer [15]. In the case of Laponite[®] XLS it was about 1 h. Next, weighed amount of chitosan was gently added and stirred another hour to dissolve the polymer. All samples had the same content 2.5% of chitosan (MCS) and different content of Laponite[®] (XLS) – TABLE 1.

TABELA 1. Opis próbek. TABLE 1. Samples' description.

Próbka Sample	Zawartość chitozanu i Laponitu [®] w hydrożelu Content of chitosan and Laponite [®] in hydrogel
M25X2	2.5% MCS/2.0% XLS
M25X5	2.5% MCS/5.0% XLS
M25X75	2.5% MCS/7.5% XLS
M25X10	2.5% MCS/10.0% XLS
M25X125	2.5% MCS/12.5% XLS

MATERIALS

Kompozyt w postaci sfer został wytrącony w 5% roztworze przeciwjonów tripolifosforanowych w celu osiągnięcia jonowego żelowania fazy chitozanowej. Po wytrąceniu sfery kompozytowe przemyto wodą destylowaną, suszono na powietrzu oraz pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 50°C.

Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR)

Pomiary FTIR przeprowadzano w pastylkach KBr z użyciem urządzenia Bruker Vertex 70V w temperaturze pokojowej, w zakresie 4000 - 400 cm⁻¹ i rozdzielczości 2 cm⁻¹.

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)

Pomiary przeprowadzono za pomocą skaningowego kalorymetru różnicowego Mettler Toledo DSC1 z oprogramowaniem STAR[®]. Program temperaturowy składał się z następujących etapów: chłodzenie od 25 do -50°C z szybkością 10°/min, wymrażanie w temperaturze -50°C przez 5 min i ogrzewanie od -50 do 230°C z szybkością 10°/min. Pomiar odbywał się w atmosferze azotu przy przepływie gazu 30 ml/min.

Test nasiąkliwości

Nasiąkliwość oznaczano jako stosunek masy wody pochłoniętej przez próbkę suchą do masy próbki suchej. Zbliżone ilości wybranych kompozytów ważono przy użyciu wagi analitycznej, a następnie inkubowano w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej przez 2 dni i ważono w określonych przedziałach czasu w celu określenia procentowego wzrostu masy kompozytu by wyznaczyć stopień absorpcji wody.

Bioaktywność in vitro - wstępna ocena

Próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 tygodnie w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) o stężeniu jonów zbliżonym do ludzkiego osocza krwi według metody Kokubo [21]. Podczas inkubacji w SBF nukleacja apatytu na powierzchni materiału uważana jest jako wstępna ocena aktywności biologicznej materiału, a wykonuje się ją przed testem in vivo w celu zmniejszenia liczby eksperymentów przeprowadzanych na zwierzętach. Roztwór SBF wymieniano co 3-4 dni (dwa razy w tygodniu). Po zakończeniu inkubacji, próbki wysuszono na powietrzu oraz w warunkach próżniowych i obserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego FEI Nova Nano SEM 200 zintegrowanego z systemem analizy EDS (EDAX Company), aby sprawdzić obecność kryształów apatytu powstałych podczas inkubacji. Wszystkie próbki zostały napylone warstwą węgla przed obserwacją SEM.

Dyfrakcja rentgenowska (XRD)

Pomiary przeprowadzano przy użyciu dyfraktometru proszkowego Philips X'Pert Pro X-ray wyposażonego w dwukołowy goniometr z geometrią Bragg-Brentano. Źródłem promieniowania była lampa rentgenowska o liniowym ognisku i anodzie miedziowej ($K_{\alpha 1} = 1,54054$ Å).

Wyniki i dyskusja

Jak podaje Mucha [22], dla chitozanu wyszczególniamy pasma referencyjne zależne i niezależne od stopnia acetylacji i deacetylacji. Dla badanych materiałów na RYS. 1 charakterystyczne pasma dla fazy chitozanowej to drgania rozciągające —C=O przy 1663 i 1626 cm⁻¹ oraz drgania zginające w płaszczyźnie — NH przy 1561 cm⁻¹. Natomiast pasma odniesienia występują dla drgań rozciągających —OH przy 3448 cm⁻¹, —CH przy 2877 cm⁻¹ oraz drganiach rozciągających —C—O przy 1159, 1074 i 1025 cm⁻¹ [22]. The composite beads were precipitated from 5% solution of tripolyphosphate counter-ions to achieve ionic gelation chitosan phase. After precipitation they were washed in distilled water, air and vacuum dried at 50°C.

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR measurements were carried out with KBr pellet method using Bruker Vertex 70v at room temperature in the range of $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ and resolution 2 cm⁻¹.

Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The measurements were performed using the Mettler Toledo DSC1 differential scanning calorimeter with STAR[®] System. Temperature program consisted following steps: cooling from 25 to -50°C with rate 10°/min, freezing at -50°C for 5 min and heating from -50 to 230°C with rate 10°/min as a main measurement.

Foregoing program was performed at nitrogen atmosphere with flow rate 30 ml/min for all samples in aluminum sealed pans. Obtained data have been evaluated in STAR[®] Software v.12 evaluation module.

Water soaking test

Water soaking was determined as the ratio of mass of absorbed water by dry sample to the mass of dry sample. Comparable mass of selected composites were weighed using an analytical scale and then incubated in distilled water at room temperature for 2 days and weighed to determine a percentage increase in composite weight what showed the degree of water uptake.

In vitro bioactivity - preliminary evaluation

Samples were incubated at 37°C for 4 weeks in Simulated Body Fluid (SBF) followed by Kokubo method with ion concentrations close to those of human blood plasma [21]. During SBF incubation apatite generation on material surface is a preliminary assessment of bioactivity carried out before *in vivo* test and therefore it reduces the number of experiments carried out with animals. SBF solution was exchanged every 3-4 days (twice a week) during incubation. Having finished the incubation, specimens were air and vacuum dried and observed using a scanning electron microscope FEI Nova Nano SEM 200 integrated with an EDS Analysis System (EDAX Company) in order to visualize apatite crystals created during incubation. All samples were coated with a thin layer of carbon before SEM observation.

X-ray diffraction (XRD)

The measurements were performed using Philips X'Pert Pro X-ray two-wheel goniometer powder diffractometer with Bragg-Brentano geometry. The radiation source was a linear focused X-ray tube and copper anode ($K_{\alpha 1} = 1.54054$ Å).

Results and Discussions

Mucha reported [22] that reference bands for chitosan are relative and non-relative from acetylation and deacetylation degree. For investigated materials characteristic bands for chitosan phase — C=O stretching vibrations at 1663 and 1626 cm⁻¹ and — NH bending vibration in a plane at 1561 cm⁻¹ can be observed (FIG. 1). Reference bands are —OH stretching vibration at 3448 cm⁻¹, —CH stretching vibration at 2877 cm⁻¹ and —C—O stretching at 1159, 1074 and 1025 cm⁻¹ [22].



RYS. 1. Widma IR dla chitozanu i kompozytów chitozan/Laponit[®]: a) M25X2, b) M25X5, c) M25X75, d) M25X10, e) M25X125, f) MCS oraz g) Laponit[®]. FIG. 1. IR spectrum of chitosan and chitosan/Laponite[®] composites: a) M25X2, b) M25X5, c) M25X75, d) M25X10, e) M25X125,

f) MCS and g) Laponite[®].

W celu pełnego scharakteryzowania otrzymanych materiałów zarejestrowano również widmo czystego chitozanu (RYS. 1f). Główne pasma występujące w widmie chitozanu (MCS) wynikają z występowania drgań rozciągających grupy OH w zakresie 3600 do 3000 cm⁻¹ i wiązania C—H w grupie —CH₂ (2890 cm⁻¹) oraz —CH₃ (2820 cm⁻¹).

Według oceny niektórych naukowców, zakres 1630-1560 cm⁻¹ jest związany z występowaniem drgań wiązania karbonylowego (C=O) grupy amidowej CONHR (amid II-rzędowy przy 1660 cm⁻¹) oraz drgań w płaszczyźnie grupy aminowej NH₂ przy 1560 cm⁻¹. Wraz ze wzrostem stopnia deacetylacji polimeru powstają nowe pasma przy 1597 cm⁻¹, które mogą wpływać na szerokości pasma od aminy pierwszorzędowej przy 1561 cm⁻¹ [22]. Na RYS. 1 i w TABELI 2 widoczne jest przesunięcie dla kilku pasm.

Dla drgań zginających grupy C=O zwiększenie ilości Laponitu[®] powoduje delikatne przesuniecie pasma w kierunku większej liczby falowej. Położenie pasm drgań grup --- NH i Si-O nie ulega zmianie. W przypadku próbki f) pasmo przy 1030 cm⁻¹ jest drganiem pochodzącym od grupy C—O w pierścieniu, grup COC oraz CH₂OH [23]. Przesunięcie pasma drgań grupy karbonylowej C=O może być związane z utworzeniem wiązania wodorowego pomiędzy sprotonowana grupa NH₂ w grupie bocznej łańcucha polimeru z ujemnie naładowaną powierzchnią pakietową płytek Laponitu[®]. Wydaje się to bardzo prawdopodobne szczególnie ze względu na znaczną wartość przesunięcia pasma (ok. 40 cm⁻¹). Dla wszystkich pasm ich przemieszczenie względem pasm czystego chitozanu i kompozytów są wynikiem zmiany stałych siłowych wiązań, co jest następstwem powstawania wiązań w procesie sieciowania. Drgania zginające grup metylenowej i metylowej występują odpowiednio także przy 1380 cm⁻¹ i 1430 cm⁻¹, (RYS. 1f), ale dla kompozytu nie są już obserwowane. Pasmo położone w pobliżu 1140 cm⁻¹ jest związane z drganiami asymetrycznymi grupy C-O w mostku tlenowym powstałym w wyniku deacetylowania chityny. Pasma te wraz ze zwiększeniem zawartości Laponitu® nakładają się tworząc jedno intensywne pasmo. Jest to spowodowane przez dominującą rolę drgań mostka tlenowego grupy C-O w strukturze Laponitu[®] [16].

TABELA 2. Liczby falowe charakterystycznych pasm dla chitozanu i kompozytów chitozan/Laponit[®].

TABLE 2. Characteristics of absorption bands for chitosan and chitosan/Laponite[®] composites.

Próbka Sample	C=O [cm⁻¹]	—NH [cm⁻¹]	—Si—O [cm⁻¹]
M25X2	1645	1561	1001
M25X5	1647	1562	1000
M25X75	1648	1562	1007
M25X10	1649	1561	1008
M25X125	1649	1561	1006
MCS	1605	1546	1030

In order to fully characterize the obtained materials, a spectrum of pure chitosan was also recorded (FIG. 1f). The main bands appearing in the spectrum of chitosan (MCS) is due to stretching vibrations of OH group in the range 3600 to 3000 cm⁻¹ and C—H bond in —CH₂ (2890 cm⁻¹) and —CH₃ (2820 cm⁻¹) groups.

According to other researchers findings, the range of 1630–1560 cm⁻¹ was related to the vibrations of carbonyl bonds (C=O) of amide group CONHR (secondary amide at 1660 cm⁻¹) and to the in-plane vibrations of amine group NH₂ at 1560 cm⁻¹. With the increase of polymer deacetylation degree additional bands were formed at 1597 cm⁻¹, which may influence the primary amine band at 1561 cm⁻¹ [22]. There are also visible bands shift for few groups – TABLE 2.

For C=O vibration band by increasing amount of Laponite® there is gentle shift of band towards higher wave numbers. Locations for ---NH and ---Si---O vibration bands do not show such shift. In the case of specimen f) band at 1030 cm⁻¹ originates from vibration of CO in the ring, COC and CH₂OH [23]. Shift of the carbonyl group C=O vibration band may be linked to form a hydrogen bond between the protonated pendant polymer chain group NH₂ with the negatively charged surface of Laponite® plate packs. Especially, due to the high value of the band-shift (approx. 40 cm⁻¹), it seems very likely. For all foregoing bands their shift between basic chitosan and composites samples bands location are resulted from change force constant of bonds, which is a consequence of formation of the bond in cross-linking process. Control over this process is crucial for optimal mechanical properties of materials.

Bending vibrations of methylene and methyl groups were also visible at 1380 cm⁻¹ and 1430 cm⁻¹, respectively (FIG. 1f), but in composites specimens these band disappear. The band located near 1140 cm⁻¹ is related to asymmetric vibrations of CO in oxygen bridge resulting from deacetylation of chitin. With increasing amount of Laponite[®] the bands overlap and create one strong band. This is caused by dominant role of vibration of CO in oxygen bridge in Laponite[®] structure [16]. Wyraźna zależność procesu sorpcji wody od stopnia deacetylacji polimeru, w skutek pęcznienia a następnie procesu suszenia, prowadzi prawdopodobnie do powstawania różnic w strukturze chitozanu zależnie od stopnia zagęszczenia, co kolejno prowadzi do różnic między wartościami literaturowymi i eksperymentalnymi w lokalizacji pasm charakterystycznych dla grup występujących w strukturze chitozanu [22]. Grupy amidowe mogą mieć różne położenie, przez co materiał może zaadsorbować więcej cząsteczek wody, które mogą mieć wpływ na położenie pasm w widmie. Ponadto im niższy stopień deacetylacji chitozanu tym niższy stopnień krystaliczności i stopień upakowania [22].

Sakurai i in. [24] oraz Zeng i in. [25] podają, że termiczna degradacja chitozanu rozpoczyna się w temperaturze około 250°C, co pozwoliło zdefiniować końcową temperaturę pomiaru DSC do 230°C. Wyznaczenie temperatury zeszklenia (T_g) chitozanu lub kompozytów chitozanu jest kwestią problematyczną. Dane literaturowe wskazują T_g w szerokim zakresie 120 do 205°C. Ocena jest trudna, ponieważ chitozan jest hydrofilowym polimerem naturalnym posiadającym niejednorodne właściwości, takie jak stopień krystaliczności, stopień deacetylacji czy średni ciężar cząsteczkowy. Jego właściwości mogą również zależeć od metody otrzymywania oraz procesu przygotowania próbki do badań [22].

Na RYS. 2 widoczny jest znaczący efekt endotermiczny o minimum piku w temperaturze 85-88°C dla wszystkich próbek. Po wykonaniu dodatkowych pomiarów stwierdzono, że jest to skutek odparowania wody uwięzionej pomiędzy pakietami Laponitu[®], pomimo długiego i starannego procesu suszenia. Potwierdzeniem jest badanie DSC (RYS. 3) oraz pomiary metodą dyfrakcji rentgenowskiej w funkcji temperatury (RYS. 4). Do wyjściowego proszku Laponite[®] XLS wykonano 3 przebiegi pomiarów DSC. Na krzywej pierwszego przebiegu widoczny jest jeden znaczący pik o charakterze endotermicznym w temperaturze 87°C, podczas gdy w drugim i trzecim przebiegu efekt ten nie jest już obserwowany. Aby potwierdzić założenie, że pik jest wynikiem odparowania wody, przeprowadzono badanie dyfrakcji rentgenowskiej w funkcji temperatury.



RYS. 2. Krzywe DSC otrzymanych kompozytów chitozan/Laponit[®].

FIG. 2. DSC curves for chitosan/Laponite[®] composites.

RYS. 4. Dyfraktogramy Laponitu[®] XLS w funkcji temperatury.

FIG. 4. Laponite[®] XLS XRD diffractograms in function of temperature.

The explicit dependence of the water sorption processes on degree of deacetylation of the polymer, leading to swelling of the sample, and then drying process probably result in the differences in the structure of the chitosan dependent on the degree of compaction: this leads to differences between literature and experimental location of bands characteristic for groups occurring in chitosan structure [22]. Amide groups may have different location thus material may absorb more water molecules which may affect the position of the bands in the spectrum. Also the degree of crystallinity of the polymer shows this dependence: lower deacetylation degree of chitosan results in lower crystallinity and packing degree [22].

Sakurai et al. [24] and Zeng et al. [25] reported that the thermal degradation of chitosan begins at about 250°C, therefore DSC measurement program temperature was carried out to 230°C. The value of the glass transition temperature (T_g) of chitosan or chitosan composites is a problematic issue. Literature data indicate T_g at wide range from 120 up to 205°C. Evaluation is difficult, because chitosan is a natural hydrophilic polymer having varying properties such as degree of crystallinity, degree of deacetylation or the molecular weight. Its properties can also depend on the origin of the extraction method and sample preparation [22].

In FIG. 2 there are visible significant endothermal peaks at about 85-88°C for all the samples. After careful investigation and performed extra measurements, it was found that this was the effect of water evaporation entrapped between Laponite[®] layers. Water was still entrapped there, despite long and careful process of drying, including vacuum drying, as confirmed by DSC (FIG. 3) and X-ray diffraction measurements (FIG. 4). For basic XLS Laponite[®] powder 3 runs of DSC measurements were made. For the first run there is one significant endothermal peak at 87°C, but in the second and the third run there is none. To confirm that this is water evaporation peak, X-ray diffraction as a function of temperature were performed.



RYS. 3. Krzywe DSC Laponitu[®] XLS. FIG. 3. DSC thermograms of Laponite[®] XLS.







Na RYS. 4 można zaobserwować, że kolejne dyfraktogramy wykonane w wybranych temperaturach są podobne, co świadczy o tym, że nie zachodzi przemiana polimorficzna - endotermiczne piki w temperaturach 85-88°C pochodzą zatem od odparowania wody międzypakietowej Laponitu[®]. Dla otrzymanych kompozytów temperaturę zeszklenia można wyznaczyć na podstawie drugiego przebiegu ogrzewania tylko dla jednej z próbek – M25X125 (RYS. 5).

Wyniki badań nasiąkliwości (RYS. 6) wykazały odpowiednią nasiąkliwość badanych próbek. Wartość nasiąkliwości wzrasta wraz ze wzrostem ilości Laponitu® w strukturze kompozytu do 104%. Według badań biomateriały bazujące na chitozanie wykazujące umiarkowaną zdolność pęcznienia, do 150%, wykazują lepsze właściwości bioaktywne, zwłaszcza lepszą proliferację komórek kostnych, niż próbki o większej zdolności pęcznienia [10].

Wstępna ocena aktywności biologicznej *in vitro* została prze-prowadzona w celu określenia zdolności materiału

do specyficznej reakcji na styku powie-rzchni implantu z tkanką [21]. Obserwacji mikroskopowych SEM dokonano na próbkach przetrzymywanych przez 5tygodniwSBF, poich wysuszeniu inapyleniu węglem. Wszystkie próbki wykazały aktywność biologiczną przejawiającą się obecnością kryształów apatytu na powierzchni badanych próbek. Jak wykazała analiza EDX powierzchnia próbek pokryta była przez kryształy apatytu (RYS. 7, a1 i b1). Widoczne były również obszary bez lub z niewielką ilością fazy apatytu (RYS. 7, a2 i b2). Jest to najprawdopodobniej spowodowane obecnością płytek Laponitu® blisko powierzchni – działają one jak centra nukleacji dla kryształów apatytu zwiększając bioaktywność kompozytów chitozanowych podobnie jak w przypadku kompozytów chitozan/ monmorylonit [20]. In FIG. 4 diffractograms performed at selected temperatures are similar suggesting that there is none polymorphic transformation – endothermic peak at 85-88°C in composites DSC curves originates from evaporation interlamellar water forming part of Laponite[®] structure. For the composites glass transition temperature can be determined on the basis of the second run for the only one sample – M25X125 (FIG. 5).

> Results of water soaking test (FIG. 6) showed adequate properties of tested specimens. Soaking capacity increasing with increased amount of Laponite® in composite structure up to 104%. According to literature data chitosan materials exhibiting moderate soaking capacity, up to 150%, show better bioactive properties, especially proliferation of bone cells, than samples with higher soaking capacity [10].

> Preliminary evaluation of the in vitro bioactivity has to define material ability to specific response at the surface of implant in contact with tissue [21]. Five week incubation in SBF samples

of obtained materials were ended by air and vacuum drying of specimens and subsequently after carbon coating the surfaces were observed using scanning electron microscope. All samples showed bioactivity as shown by apatite crystals formed and growth. As confirmed by EDX analysis on the surfaces of specimens the areas covered by apatite crystals vere visible (FIG. 7 a1 and b1) and also there were areas of composites without apatite layer (FIG. 7 a2 and b2). It is presumably caused by the presence of Laponite[®] plates near the surface – they act as nucleation centers for apatite crystals thus improving bioactivity of chitosan composites similar like in chitosan/montmorillonite composites [20]. Also there is no significant visible difference in the case of amount of apatite crystals on the surface of the composites.







RYS. 7. Mikrofotografie SEM z analizą EDX po inkubacji w SBF dla: a) M25X75 i b) M25X125. FIG. 7. SEM microphotographs with EDX analysis after SBF incubation for: a) M25X75 and b) M25X125.

Podsumowanie

Celem badań była optymalizacja sposobu otrzymywania bioaktywnego układu biopolimer/krzemian warstwowy, jako nanokompozytu opartego na chitozanie i syntetycznym krzemianie warstwowym przez reakcję sieciowania z użyciem trójpolifosforanu sodowego, jako czynnika żelującego. Badania FTIR potwierdziły proces sieciowania między grupami bocznymi łańcuchów chitozanu i zdyspergowanych płytek Laponitu® XLS. Zastosowanie nieorganicznego środka sieciującego wyeliminowało konieczność użycia powszechnie stosowanych substancji organicznych, które są szkodliwe dla żywych organizmów. Laponite® umożliwia również przeprowadzanie powtarzalnych syntez z uwagi na jego syntetyczne pochodzenie, które zapewnia jego stały skład - jest to konieczne w procesie otrzymywania biomateriałów do zastosowań medycznych. Otrzymane kompozyty wykazywały właściwości bioaktywne potwierdzone wynikami badań metodą Kokubo oraz charakteryzowały się nasiąkliwością odpowiednią do adhezji i wzrostu komórek kostnych.

Optymalizacja struktury materiału przez sieciowanie i chemiczną modyfikację fazy hydrożelowej może być najlepszym sposobem na uzyskanie obiecujących inteligentnych materiałów dla inżynierii tkanki kostnej.

Podziękowania

Badania finansowane w ramach badań statutowych 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH w Krakowie.

Conclusions

The aim of this study was to optimize a method of receiving a bioactive system biopolymer/layered silicate nanocomposite based on chitosan and a synthetic clay by a cross-linking reaction using sodium tripolyphosphate as the gel factor. The resultant composites exhibited bioactive properties confirmed by Kokubo method and optimal water soaking ability for cell adherence and growth. FTIR study confirmed cross-linking interaction between pendant groups of chitosan chains and dispersed exfoliated Laponite[®] XLS plates. Inorganic cross-linker eliminated commonly used organics which are damaging for living organism. Laponite[®] enables to perform reproducible syntheses owing to its synthetic origin which assures fixed composition – it is necessary in the case of materials for medical application.

Optimization of material structure by cross-linking and chemical modification of hydrogel phase can be the best way to obtain prospective smart materials for bone tissue engineering.

Acknowledgements

Research funded under statutory researches 11.11.160.616 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology.

38

Piśmiennictwo

[1] Sabu T., Kuruvilla J., Malhotra S. K., Goda K., Sreekala M. S.: Polymer Composites:Nanocomposites (Volume 2), Weinheim 2013 [2] Muller Werner E.G., Wang X., Schroder Heinz C.: Inorganic Polyphosphates: Biologically Active Biopolymers for Biomedical Applications(Chapter 10), Heidelberg 2013

[3] Shan-hui Hsu, Yu-Bin Chang, Ching-Lin Tsai, Keng-Yen Fu, Shu-Hua Wang, Hsiang-Jung Tseng: Characterization and biocompatibility of chitosan nanocomposites. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 85 (2011) 198-206.

[4] Pielichowska K., Błażewicz S.: Bioactive polymer/hydroxyapatite (nano)composites for bone tissue regeneration. Advances in Polymer Science 232 (2010) 97-207

[5] Miaomiao Liu, Haijia Su, Tianwei Tan: Synthesis and properties of thermo- and pH-sensitive poly(N-isopropylacrylamide)/polyaspartic acid IPN hydrogels. Carbohydrates Polymers 87(2012) 2425-2431. [6] Nwe, N. & Stevens, W. F.: Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. Biotechnology Letters 24 (2002) 131-134.

[7] Pachence J. M., Bohrer M. P., Kohn J.: Biodegradable Polymers (Chapter 23), Principles of tissue engineering (Third Edition) (2007) 323-339.

[8] Malette, W., Quigley, M., and Adicks, E.: Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration, Plenum Press, New York (1986) 435-442

[9] Dash M., Chiellini F., Ottenbrite R.M., Chiellini E.: Chitosan -A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science 36 (2011) 981-1014.

[10] Ta H.T., Dass C.R., Dunstan D.E.: Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. Journal of Controlled Release 126 (2008) 205-216.

[11] Ravichandran R., Sundarrajan S., Venugopal J.R., Mukherjee S., Ramakrishna S.: Advances in Polymeric Systems for Tissue Engineering and Biomedical Applications. Macromolecular Bioscience 12 (2012) 286-311.

[12] Buenger D., Topuz F., Groll J.: Hydrogels in sensing applications. Progress in Polymer Science 37 (2012) 1678-1719.

[13] Hennink W.E., van Nostrum C.F.: Novel crosslinking methods to design hydrogels. Advanced Drug Delivery Reviews 64 (2012) 223-236.

[14] Giri T.K., Thakur A., Alexander A., Ajazuddin, Badwaik H., Tripathi D.K.: Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. Acta Pharmaceutica Sinica B 2(5) (2012) 439-449. [15] http://www.byk.com/; 22-05-2014.

[16] Ruzicka B., Zaccarelli E.: A fresh look at the Laponite phase diagram. Soft Matter 7 (2011) 1268-1286

[17] Yang H., Hua S., Wenbo Wang W., Wang A.: Composite Hydrogel Beads Based on Chitosan and Laponite: Preparation, Swelling, and Drug Release Behaviour. Iranian Polymer Journal 20/6 (2011) 479-490.

[18] Gaharwar A.K., Schexnailder P.J., Kline B.P., Schmidt G.: Assessment of using Laponite[®] cross-linked poly(ethylene oxide) for controlled cell adhesion and mineralization. Acta Biomaterialia 7 (2011) 568-577.

[19] Ghadiri M., Chrzanowski W., Lee W.H., Fathi A., Dehghani F. Rohanizadeh R.: Physico-chemical, mechanical and cytotoxicity characterizations of Laponite®/alginate nanocomposite. Applied Clay Science 85 (2013) 64-73.

[20] Paluszkiewicz C., Stodolak-Zych E., Kwaitek W., Jeleń P.: Bioactivity of a Chitosan based Nanocaomposite. Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering 10 (2011) 95-106. [21] Kokubo T., Takadama H.: How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. Biomaterials 27 (2006) 2907-2915.

[22] Mucha M.: Chitozan: wszechstronny polimer ze źródeł odnawialnych, WNT, Warszawa 2010.

[23] Peng Li, Nam Hoon Kim, David Hui, Kyong Yop Rhee, Joong Hee Lee,: Improved mechanical and swelling behavior of the composite hydrogels prepared by ionic monomer and acid-activated Laponite, Applied Clay Science 46 (2009) 414-417.

[24] Sakurai K., Maegawa T., Takahashi T.: Glass transition temperature of chitosan and miscibility of chitosan/poly(N-vinyl pyrrolidone) blends. Polymer 41 (2000) 7051-7056.

[25] Wen Zeng, Jinghui Huang, Xueyu Hu, Wei Xiao, Mengyao Rong, Zhi Yuan, Zhuojing Luo: Ionically cross-linked chitosan microspheres for controlled release of bioactive nerve growth factor. International Journal of Pharmaceutics 421 (2011) 283-290.

References





STUDIA PODYPLOMOWE Biomateriały – Materiały dla Medycyny 2014/2015

Organizator:	Adres:
Akademia Górniczo-Hutnicza	30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30
im. Stanisława Staszica w Krakowie	Pawilon A3, p. 208 lub p. 501
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki	tel. 12 617 44 48; fax. 12 617 33 71
Katedra Biomateriałów	email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik:	http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/stu-
Dr hab. inż. Elżbieta Pamuła, prof. AGH	dia-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: *in vitro* i *in vivo*). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Studenci zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.

Sylwetka absolwenta:

Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia), a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny.

Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.

Zasady naboru:

Termin zgłoszeń: od 20.09.2014 do 20.10.2014 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej

Opłaty: 2 600 zł

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:

ozao a mamar	
2 semestry (od XI 2014 r. do VI 2015 r.)	

Informacje dodatkowe:

Zajęcia: 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu. Przewidywana liczba godzin: 160.

.