

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 127
Numer 127
Volume XVII
Rok XVII

OCTOBER 2014
PAŹDZIERNIK 2014

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:
WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Krakow**
Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**
KOMITET
REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief
Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor
Redaktor
Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial
Sekretarz redakcji
Design
Projekt
Katarzyna Trała
Augustyn Powroźnik

**ADDRESS OF
EDITORIAL OFFICE:**
ADRES REDAKCJI:

AGH-UST
30/A3, Mickiewicz Av.
30-059 Krakow, Poland
Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Issue: 250 copies
Nakład: 250 egz.

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



**EDITORIAL BOARD
KOMITET REDAKCYJNY**

EDITOR-IN-CHIEF

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

EDITOR

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

**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

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

Romuald Będziński - WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

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

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

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

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias 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 - SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

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

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

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

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

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

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

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

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

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

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

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

www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41

Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN

Konto:

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów

30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3

ING Bank Śląski S.A. O/Kraków

nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:

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

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website:

www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:

Cost of one number: 20 PLN

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials

30/A3, Mickiewicz Av.

30-059 Krakow, Poland

ING Bank Śląski S.A.

account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

The annual conference of the European Society for Biomaterials

27th European Conference on Biomaterials



www.esb2015.org

ESB 2015

30 August–3 September
Kraków, Poland



SPIS TREŚCI

ROLA WISKOSUPLEMENTACJI W PROFILAKTYCE I LECZENIU CHOROBY ZWYRODNIENIOWEJ STAWU KOLANOWEGO - PRZEGLĄD DANYCH DOTYCZĄCYCH HYLANU G-F 20 ŁUKASZ SZELERSKI, MACIEJ AMBROZIAK, PAWEŁ SKOWRONEK, PAWEŁ MAŁDYK	2
WŁAŚCIWOŚCI ŚCIERNE STOPÓW Co-Cr W ZAWIESINIE CERAMIKA-SZTUCZNA ŚLINA JOANNA AUGUSTYN-PIENIAŻEK, PAWEŁ KURTYKA, JOLANTA STOPKA	7
BIODEGRADOWALNE POLIMERY FUNKCYJNE – ROZSZERZENIE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA BIOMATERIAŁÓW MICHAŁ KAWALEC, MAŁGORZATA PASTUSIAK, JOANNA JAWORSKA, PATRYCJA KOMAR, PIOTR KURCOK, PIOTR DOBRZYŃSKI	16
NANOKOMPOZYT POLY(ε-KAPROLAKTON)/TLENKI ŻELAZA DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH MAŁGORZATA ŚWIĘTEK, JUSTYNA GWIZDAŁA, WALDEMAR TOKARZ, ELŻBIETA MENASZEK, MARTA BŁAŻEWICZ	22
INTEGRIN α_v SIGNALING INFLUENCES PHENOTYPE AND MATURATION OF PRIMARY HUMAN OSTEOBLASTS ON ALUMINA SURFACE EDYTA WRÓBEL, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY, PIOTR MRÓWKA, ELIZA GŁODKOWSKA-MRÓWKA	33

CONTENTS

THE ROLE OF VISCOSUPPLEMENTATION IN PREVENTION AND TREATMENT OF KNEE OSTEOARTHRITIS - REVIEW OF DATA CONCERNING HYLAN G-F 20 ŁUKASZ SZELERSKI, MACIEJ AMBROZIAK, PAWEŁ SKOWRONEK, PAWEŁ MAŁDYK	2
ABRASIVE BEHAVIOUR OF Co-Cr ALLOYS IN THE CERAMIC MATERIAL-ARTIFICIAL SALIVA SUSPENSION JOANNA AUGUSTYN-PIENIAŻEK, PAWEŁ KURTYKA, JOLANTA STOPKA	7
BIODEGRADABLE FUCTIONAL POLYMERS – EXTENDING FRONTIERS OF BIOMATERIALS MICHAŁ KAWALEC, MAŁGORZATA PASTUSIAK, JOANNA JAWORSKA, PATRYCJA KOMAR, PIOTR KURCOK, PIOTR DOBRZYŃSKI	16
POLY(ε-CAPROLACTONE)/IRON OXIDES NANOCOMPOSITE FOR MEDICAL APPLICATIONS MAŁGORZATA ŚWIĘTEK, JUSTYNA GWIZDAŁA, WALDEMAR TOKARZ, ELŻBIETA MENASZEK, MARTA BŁAŻEWICZ	22
INTEGRIN α_v SIGNALING INFLUENCES PHENOTYPE AND MATURATION OF PRIMARY HUMAN OSTEOBLASTS ON ALUMINA SURFACE EDYTA WRÓBEL, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY, PIOTR MRÓWKA, ELIZA GŁODKOWSKA-MRÓWKA	33

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

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

ROLA WISKOSUPLEMENTACJI W PROFILAKTYCE I LECZENIU CHOROBY ZWYRODNIENIOWEJ STAWU KOLANOWEGO - PRZEGLĄD DANYCH DOTYCZĄCYCH HYLANU G-F 20

ŁUKASZ SZELERSKI, MACIEJ AMBROZIAK, PAWEŁ SKOWRONEK,
PAWEŁ MAŁDYK

KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU,
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,
UL. LINDLEYA 4, 02-005 WARSZAWA

Streszczenie

Wiskosuplementacja jest jedną z metod nieoperacyjnego leczenia choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Polega na uzupełnianiu ilości endogennego kwasu hialuronowego w stawie za pomocą jednej lub kilku iniekcji. Zmniejsza dolegliwości bólowe pacjenta i poprawia zakres ruchomości stawu.

Autorzy przeanalizowali literaturę dotyczącą badań nad wynikami stosowania wiskosuplementacji u pacjentów z gonartrozą i podjęli próbę uporządkowania wiedzy dotyczących jego stosowania. Ocenie poddano prace porównawcze działania kwasu hialuronowego vs placebo, analizy dotyczące wpływu budowy cząsteczki preparatu na efekt leczniczy, a także porównania z iniekcjami kortykosteroidowymi.

Iniekcje dostawowe kwasu hialuronowego są efektywną i bezpieczną metodą w profilaktyce i leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Zmniejszają dolegliwości bólowe oraz poprawiają funkcję ruchową u pacjentów. Notuje się niewielki odsetek działań niepożądanych po podaniu. Działanie kwasu hialuronowego nie ogranicza jedynie subiektywnych odczuć chorego. Istnieją opracowania, które wskazują na zmniejszenie degradacji chrząstki stawowej w badaniu MRI, u pacjentów stosujących wiskosuplementację. Wykazano przewagę kwasu hialuronowego nad iniekcjami kortykosteroidowymi, które chociaż dają szybszy efekt przeciwbólowy, działają krócej i stanowią czynnik uszkodzający chrząstkę stawową. Pozwalają odroczyć alloplastykę stawu kolanowego u pacjentów z zaawansowaną gonartrozą (Kellgren-Lawrence IV), a w grupie chorych poddanych artroskopii stawu kolanowego, skracając okres rekonwalescencji.

Wiskosuplementacja jest efektywną i bezpieczną metodą leczenia objawowej gonartrozy i stanowi uzupełnienie lub alternatywę dla stosowania innych technik terapii zachowawczej.

Słowa kluczowe: wiskosuplementacja, hylan G-F 20, gonartroza, kwas hialuronowy

[Inżynieria Biomateriałów 127 (2014) 2-6]

THE ROLE OF VISCOSUPPLEMENTATION IN PREVENTION AND TREATMENT OF KNEE OSTEOARTHRITIS - REVIEW OF DATA CONCERNING HYLAN G-F 20

ŁUKASZ SZELERSKI, MACIEJ AMBROZIAK, PAWEŁ SKOWRONEK,
PAWEŁ MAŁDYK

CATHEDRAL AND CLINIC OF ORTHOPAEDICS
AND TRAUMATOLOGY OF THE MOTOR SYSTEM,
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW
LINDLEYA 4 ST., 02-005 WARSAW, POLAND

Abstract

Viscosupplementation is one of the nonsurgical methods of treating the knee osteoarthritis. In this procedure the amount of endogenous hyaluronic acid is supplemented by means of one or several joint injections. Such a treatment relieves pain and improves the range of the joint motion.

The authors analyzed the research literature concerning viscosupplementation in patients with gonarthrosis and attempted to organize the knowledge concerning the hyaluronic acid application. The following papers were taken into consideration: comparative studies of hyaluronic acid versus placebo efficacy, analyses of the structure of the HA and its overall effectiveness, and comparison studies of hyaluronic acid vs. corticosteroid injections.

Hyaluronic acid joint injections are an effective and safe method in protection and treatment of knee osteoarthritis. They relieve pain and improve the range of joint motion. There have been only few side effects noted. The application of hyaluronic acid provides subjective positive feelings in patients, yet there are also studies proving that viscosupplementation leads to the decrease of cartilage degradation, as shown in MRI tests. There is a clear advantage of hyaluronic acid over corticosteroid injections – even though the latter relieve pain faster, they act for a shorter period of time and they damage the cartilage in due course. Hyaluronic acid injections postpone the necessity of knee alloplastic reconstruction in patients with advanced gonarthrosis, and in patients who underwent knee arthroscopy the recovery time is shortened.

Viscosupplementation is an effective and safe treatment for gonarthrosis. It may be either a complementation or an alternative to other noninvasive techniques.

Keywords: viscosupplementation, hylan G-F 20, gonarthrosis, hyaluronic acid

[Engineering of Biomaterials 127 (2014) 2-6]

Wprowadzenie

Wiskosuplementacja, czyli podawanie kwasu hialuronowego w iniekcjach dostawowych, jest ogólnie uznaną metodą w nieoperacyjnym leczeniu zmian chrzęstnych stawu kolanowego [1-4]. Polega na uzupełnianiu jego ilości poprzez stosowanie iniekcji dostawowych w różnych schematach podawania - od jednego do pięciu wstrzyknięć [1,2,5-7].

W warunkach fizjologicznych kwas hialuronowy jest syntetyzowany i wydzielany do płynu stawowego przez komórki błony maziowej. Poprawia dzięki temu właściwości lepko-sprężyste płynu stawowego i odgrywa istotną rolę w prawidłowym ruchu stawu [7,8]. W przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego zmniejsza się stężenie i gęstość endogennego kwasu hialuronowego, co powoduje dolegliwości bólowe i pogorszenie zakresu ruchomości stawu [5,6]. Niewątpliwą zaletą kwasu hialuronowego jest minimalna ilość działań niepożądanych [1,2,5,6,9].

Material i metody

Celem pracy jest przegląd piśmiennictwa dotyczącego wiskosuplementacji w profilaktyce i w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Autorzy pracy podjęli próbę usystematyzowania wiedzy na temat wskazań do stosowania kwasu hialuronowego (HA), schematu jego podawania, skuteczności działania, bezpieczeństwa podawania i ryzyka ewentualnych powikłań.

Wyniki i dyskusja

Istnieje wiele publikacji potwierdzających przeciwzapalne i przeciwbólowe działanie kwasów hialuronowych [10-12], ale tylko niektóre preparaty wykazały działanie osłaniające na chrząstkę stawową [13]. Kwasy hialuronowe mogą zatem stanowić alternatywę dla stosowania doustnych niesterydowych preparatów przeciwzapalnych oraz iniekcji glikokortykosteroidów [10,14]. Co najistotniejsze, podawanie hialuronianu w iniekcji umożliwia stabilizację struktury chemicznej płynu stawowego. Dzięki temu poprawia się „smarowanie” stawu, co bezpośrednio zmniejsza ból i zwiększa ruchomość stawu [5-7]. Pojawiają się publikacje, które wskazują na związek samej budowy cząsteczki pochodnych kwasu hialuronowego z jego działaniem. Preparat o większej masie cząsteczkowej jest bowiem bardziej odporny na enzymatyczną degradację, a przez to wykazuje dłuższe działanie terapeutyczne [5,15,16]. Często już po pierwszym zastrzyku chorzy odczuwają istotną poprawę kliniczną [17,18]. Pamiętać jednak należy, że kwas hialuronowy nie jest lekiem przeciwbólowym, a jego działanie to przede wszystkim poprawa parametrów fizyko-chemicznych płynu stawowego i chrząstki stawowej. Tymczasem efekt ten występuje dopiero po kilku tygodniach od podania pierwszej dawki leku [6,7,10].

Powszechnie akceptowanym wskazaniem do stosowania wiskosuplementacji są zmiany chrzęstne spełniające kryteria radiologiczne OA w skali Kellgren-Lawrence II-III stopnia. Interesującym doniesieniem w tym zakresie była analiza wpływu wiskosuplementacji hylanem G-F 20 na grubość i powstawanie ubytków chrząstki stawowej w obrazie MRI [13]. Dotychczas powszechny był pogląd, że stosowanie preparatów HA jest efektywne i bezpieczne w leczeniu objawów gonartrozy. Brakowało natomiast publikacji oceniających w sposób ilościowy parametry chrząstki stawowej w badaniach obrazowych.

Introduction

Viscosupplementation, which is injecting hyaluronic acid into a joint, is a widely-recognized method in nonsurgical treatment of cartilage deterioration in knee [1-4]. The treatment consists of a regimen of joint injections – up to five doses [1,2,5-7].

In physiological conditions hyaluronic acid is synthesized and secreted in the synovial membrane. It improves lubricant properties of the joint fluid and plays an important role in the proper joint motion [7,8]. In the course of osteoarthritis the concentration and density of endogenous hyaluronic acid diminish, which cause pain and limit the range of joint motion [5,6]. The unquestionable advantage of hyaluronic acid are minimal side effects [1,2,5,6,9].

Material and methods

The aim of this work is to review the literature concerning viscosupplementation in protection and treatment of knee osteoarthritis. The authors attempted to summarise the knowledge of: recommendations for hyaluronic acid treatment (HA), dosage and administration schedule, efficacy of regimen, safety of treatment, and risk of complications.

Results and discussion

There are several scientific papers confirming anti-inflammatory and painkilling effect of hyaluronic acids [10-12], still only some of HA medicines seem to protect the joint cartilage [13]. Therefore, hyaluronic acids may be an alternative to oral administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs or glucocorticosteroid injections [10,14]. What is most important, injecting hyaluronic acid stabilizes the chemical structure of the synovial fluid. Thus “the lubrication” of the joint improves, which directly leads to pain relief and improves the joint motion range [5-7]. There have been works implicating the connection between the structure of the HA and its performance. Namely, the hyaluronic acid preparation with higher molecular weight is more resistant to enzyme degradation, thus displaying longer therapeutic activity [5,15,16]. Already after the first injection patients often feel essential clinical improvement [17,18]. Still it is worth reminding that hyaluronic acid is not a painkiller and its application leads mostly to improving physical-chemical properties of the synovial fluid and joint cartilage. This effect does not appear until a few weeks after the first dose of medicine is applied [6,7,10].

The widely accepted recommendation for viscosupplementation is the cartilage damage of grade 2-3 in Kellgren-Lawrence scale of the radiographic criteria for OA classification. An interesting report was the analysis of effects of hylan G-F 20 viscosupplementation on cartilage thickness and its preservation, detected by MRI [13]. So far there has been a common notion that HA application is a safe treatment for gonarthrosis. Yet there have not been papers concentrating the quantitative assessment of cartilage parameters performed by means of MRI.



RYS. 1. Ampułko-strzykawka z kwasem hialuronowym do pojedynczego wstrzyknięcia.

Źródło:

<https://www.synvisc-one.com.au/home.aspx>

FIG. 1. Single-dose injection of hyaluronic acid.

Source:

<https://www.synvisc-one.com.au/home.aspx>

Utworzono dwie grupy pacjentów - jedna otrzymywała cztery dawki HA (hylan G-F 20) (RYS. 1) w odstępach sześciomiesięcznych, a druga pozostawała bez interwencji. Okres obserwacji wynosił 24 miesiące. Dokonywana była trzykrotna ocena MRI stawów kolanowych (wyjściowo, po dwunastu i po dwudziestu czterech miesiącach), podczas której badano objętość chrząstki oraz tendencję do tworzenia ubytków. W dwunastym miesiącu od rozpoczęcia w/w badania nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic. Wyraźna różnica stała się widoczna dopiero po dwóch latach obserwacji (4 dawki hylanu G-F 20) i wyrażała się większą objętością chrząstki na plateau piszczeli w grupie stosującej wiskosuplementację.

Wnioski z publikacji są jednoznaczne: stosowanie wiskosuplementacji hylanem G-F 20 przyczynia się do zredukowania stopnia zużycia chrząstki stawowej, co potwierdza ocena jej objętości i stopień zaawansowania ognisk chondromalacji w badaniu MRI. Istotny statystycznie efekt pojawia się zatem dopiero w 24-tym miesiącu obserwacji.

W naszej codziennej praktyce lekarskiej spotykamy się często z dylematem, czy rekomendować wiskosuplementację pacjentom z IV stopniem zmian chrzęstnych wg Kellgren i Lawrence. Pacjenci ci mają już wskazania do protezoplastyki (TKA), ale z różnych powodów chcą odwleć w czasie decyzję o leczeniu operacyjnym. Na uwagę zasługuje praca [19], w której retrospektywnej analizie poddano wpływ wiskosuplementacji hylanem G-F 20 na decyzję pacjenta z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową (IV stopień wg Kellgren-Lawrence) o odroczeniu przeprowadzenia alloplastyki stawu kolanowego. We wnioskach autorzy pracy podają, że u 75% pacjentów po wiskosuplementacji hylanem G-F 20 udało się odroczyć zabieg protezoplastyki o średnio 638 dni (1,8 roku).

Artykuł wskazuje również na to, że wiskosuplementacja może opóźnić konieczność przeprowadzenia TKA u chorych z zaawansowaną gonartrozą. Jest to szczególnie korzystne u pacjentów, którzy boją się operacji albo ich choroby towarzyszące zwiększają ryzyko powikłań.

Często w przypadkach zaawansowanych zmian chrzęstnych zalecamy iniekcje kortykosteroidowe, które są dużo tańsze i dają często szybki efekt przeciwbólowy. Interesującą wydaje się być praca [10] porównująca efektywność kuracji preparatem HA (hylan G-F 20) w stosunku do iniekcji kortykosteroidowej. Autorzy ocenili redukcję dolegliwości bólowych (skala VAS) oraz poprawę funkcji stawu kolanowego (skala WOMAC) podczas sześciomiesięcznej obserwacji. W badaniu wzięły udział dwie grupy pacjentów poddanych randomizacji. Pierwsza grupa otrzymała 3 wstrzyknięcia HA (hylan G-F 20) w odstępach tygodniowych. Druga natomiast - pojedynczą dawkę steroidu dostawowo (triamcynolone).

Two groups of patients were formed – one of them received four courses of HA (hylan G-F 20) (FIG. 1) every six months, the other group was left untreated. The observation of patients lasted for 24 months. MRI testing was performed on knee cartilage three times (initially, after a year and after 24 months) to assess the cartilage volume and its tendency to deteriorate. No statistically significant differences were noted in the 12th month of tests. However, the distinct difference was observed after two years (after 4 courses of hylan G-F 20) – there was larger cartilage volume on the tibial plateau in the group undergoing viscosupplementation.

The conclusions of this work are explicit: viscosupplementation with hylan G-F 20 reduces the cartilage deterioration, which has been proved by MRI assessment of the cartilage volume and the advancement of chondromalacia. The statistically significant effect appears in the 24th month of observation.

In our everyday medical practice there is a common dilemma whether to recommend viscosupplementation to patients with grade 4 cartilage damage in Kellgren-Lawrence system. They are already indicated for TKA (total knee reconstruction) but – for many reasons – such patients want to postpone the decision about surgery. One scientific paper is especially worth noting in that matter [19]. It is a retrospective study how viscosupplementation with hylan G-F 20 delayed the decision about total knee replacement in patients suffering from advanced osteoarthritis (grade 4 in Kellgren-Lawrence system). The authors conclude that 75% of patients treated with hylan G-F 20 viscosupplementation delay the alloplastic reconstruction for approximately 638 days (1.8 year).

The paper also claims that viscosupplementation may also postpone the necessity of total knee arthroplasty for patients with advanced gonarthrosis. It is especially beneficial for patients who are afraid of surgery or whose other illnesses increase the risk of complications.

Corticosteroid injections are often recommended for advanced cartilage deterioration, since they are much cheaper and relieve pain faster than HA supplementation. The study comparing the effectiveness of hylan G-F 20 with corticosteroid injections [10] is an interesting point in the discussion. The authors assessed the management of pain (using VAS scale for pain) and improvement in knee functioning (in WOMAC scale) during 6-month observation. In the experiment there were two randomized groups of patients. The first group received three injections of HA (hylan G-F 20) in weekly increments. The other group received a single joint injection of corticosteroid (i.e. triamcinolone).

W pierwszych dwóch tygodniach w grupie sterydowej zaobserwowano przewagę w redukcji bólu w porównaniu do grupy leczonej HA. Parametry bólowe były zbliżone w czwartym tygodniu obserwacji. Trend odwracał się jednak po pierwszym miesiącu stosowania na korzyść chorych otrzymujących wiskosuplementację hylanem G-F 20, co zaobserwowano w dwunastym i dwudziestym szóstym tygodniu. Podobna sytuacja miała miejsce przy ocenie funkcji stawu wg skali WOMAC. Udowodniono zatem, że stosowanie wiskosuplementacji u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego pozwala na utrzymanie długotrwałych efektów terapeutycznych, polegających na zmniejszeniu dolegliwości bólowych oraz poprawie funkcji kończyny dolnej. Iniekcje kortykosteroidowe, mimo że charakteryzują się szybszym działaniem przeciwbólowym, stanowią czynnik uszkadzający chrząstkę stawową i powinny być stosowane okazjonalnie.

Wiskosuplementacja stanowi również alternatywę do stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) [14]. Skuteczność została potwierdzona w wielośrodkowym badaniu, przeprowadzonym w Japonii [20]. Ponadto wskazuje się na mniejszą ilość działań niepożądanych w stosunku do NLPZ.

Aktualnie istnieje tendencja do stosowania HA w pojedynczych wstrzyknięciach ze względu na możliwość zmniejszenia ryzyka związanego z samym wstrzyknięciem (takiego jak zakażenia stawu [16,17]. W badaniach tych, w ramach praktyki klinicznej obserwowano istotne zmniejszenie bólu związanego z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego już tydzień po pojedynczym wstrzyknięciu HA (hylan G-F 20), a poprawa utrzymywała się przez cały okres obserwacji wynoszący 12 miesięcy.

U części chorych, u których w przebiegu gonartrozy występują uszkodzenia struktury łąkotek oraz przerost błony maziowej, stosuje się techniki chirurgiczne, tj. artroskopowe opracowanie uszkodzeń (debridement). W tej grupie pacjentów wiskosuplementacja stosowana pooperacyjnie również poprawia jakość życia i przyczynia się do zmniejszenia dolegliwości w trakcie rekonwalescencji [21,22].

Na zakończenie warto jeszcze podkreślić, iż terapia kwasem hialuronowym nie wiąże się ze zwiększonymi kosztami dla pacjenta, w porównaniu z innymi metodami leczenia zachowawczego gonartrozy, jak niesteroidowe leki przeciwzapalne czy kortykosteroidy [23,24].

Wnioski

Wiskosuplementacja jest uznaną metodą leczenia zmian chrzęstnych stawu kolanowego. Poprzez zmniejszenie dolegliwości bólowych, poprawę funkcji ruchowej kolana, zwiększa komfort życia pacjenta u chorych z gonartrozą, a w najcięższych przypadkach choroby pozwala odroczyć leczenie operacyjne. Cechuje się mniejszą ilością działań niepożądanych niż stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz kortykosteroidów. Choć niewiele jest badań opartych na dużej grupie pacjentów to jednak ta metoda na stałe zagościła w naszej codziennej praktyce lekarskiej. Warto stosować preparaty, których skuteczność i dobrą tolerancję potwierdzono badaniami naukowymi.

The first two weeks brought the better pain management in the corticosteroid-treated patients, as compared to the HA-treated group. In the fourth week of observation the pain parameters were similar. However, after the first month the HA-treated patients showed the advantage over the corticosteroid-treated group, which was observed in the 12th and 26th week. Meanwhile, the same phenomenon was also noted during the assessment of joint functioning in WOMAC scale. Thus it has been proven that viscosupplementation in patients with osteoarthritis provides long-lasting therapeutic effects, such as pain relief and improved functioning of the limb. Although corticosteroid injections are faster painkillers, they damage the cartilage tissue and should be applied occasionally.

Viscosupplementation is also an alternative to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) [14]. It has also fewer side effects in comparison with NSAIDs. The HA injections' effectiveness was clearly shown in a multi-center trial conducted in Japan [20].

Nowadays, there is a tendency to apply HA in single injections in order to minimize the risk connected with the procedure alone, e.g. joint infection [16,17]. In these studies, in clinical practice, significant pain relief was observed in patients with osteoarthritis already a week after the HA injection (hylan G-F 20), and the improvement lasted for the whole 12 months of observation.

In some patients with gonarthrosis, who also suffer from meniscal defects and overgrowth of the synovial membrane, surgical techniques are applied, such as arthroscopic debridement. Viscosupplementation applied after the surgery improves the patients' quality of life and diminishes disadvantages of recovery time [21,22].

In conclusion, it is worth emphasizing that hyaluronic acid therapy is not more expensive for patients than other methods of treating gonarthrosis, such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs or corticosteroids [23,24].

Conclusions

Viscosupplementation is a well-recognized method of treating knee osteoarthritis. Due to the pain relief and widening the knee motion range, it improves the life comfort of patients with gonarthrosis, and in the most severe cases it delays the need for surgical treatment. It is also characterized by fewer side effects as compared to nonsteroidal anti-inflammatory drugs or corticosteroids. Although there have not been many trials performed in large groups of patients, this method is a common practice in nowadays medicine. It is worth applying the product whose efficacy and good tolerance is approved of by scientific research.

Piśmiennictwo

- [1] Colen S., van den Bekerom M.P.J., Mulier M., et al.: Hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis. A systematic review and meta-analysis with emphasis on the efficacy of different products. *BioDrugs* 26(4) (2012) 257-268.
- [2] Bellamy N., Campbell J., Welch V., et al.: Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee (Review). *The Cochrane Library* (2009), Issue 1. Published by JohnWiley & Sons, Ltd.
- [3] Modawal A., Ferrer M., Choi H.K., Castle J.A.: Hyaluronic acid injections relieve knee pain. *J Fam Pract.* 54(9) (2005) 758-767.
- [4] Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. *Arthritis Rheum.* 43(9) (2000) 1905-1915.
- [5] Wobig M., Dickhut A., Maier R., Vetter G.: Viscosupplementation with hylan G-F 20: a 26-week controlled trial of efficacy and safety in the osteoarthritic knee. *Clin Ther.* 20(3) (1998) 410-423.
- [6] Chevalier X., Jerosch J., Goupille P., van Dijk N., Luyten F.P., Scott D.L., Bailleul F., Pavelka K.: Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary osteoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis.* 69(1) (2010) 113-119.
- [7] Conrozier T., Jerosch J., Beks P., Kemper F., Euller-Ziegler L., Bailleul F., Chevalier X.: Prospective, multi-centre, randomised evaluation of the safety and efficacy of five dosing regimens of viscosupplementation with hylan G-F 20 in patients with symptomatic tibio-femoral osteoarthritis: a pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 129(3) (2009) 417-423.
- [8] Raman R., Dutta A., Day N., Sharma H.K., Shaw C.J., Johnson G.V.: Efficacy of Hylan G-F 20 and Sodium Hyaluronate in the treatment of osteoarthritis of the knee – a prospective randomized clinical trial. *Knee* 15(4) (2008) 318-24.
- [9] Wang C-T, Lin J., Chang C-J, et al.: Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am* 86-A (3) (2004) 538-545.
- [10] Caborn D., Rush J., Lanzer W., Parenti D., Murray C.; Synvisc 901 Study Group: A randomized, single-blind comparison of the efficacy and tolerability of hylan G-F 20 and triamcinolone hexacetonide in patients with osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 31(2) (2004) 333-343.
- [11] Raynauld J.P., Torrance G.W., Band P.A., Goldsmith C.H., Tugwell P., Walker V., Schultz M., Bellamy N.; Canadian Knee OA Study Group: A prospective, randomized, pragmatic, health outcomes trial evaluating the incorporation of hylan G-F 20 into the treatment paradigm for patients with knee osteoarthritis (Part 1 of 2): clinical results. *Osteoarthritis Cartilage* 10(7) (2002) 506-517.
- [12] Migliore A., Giovannangeli F., Granata M., Laganà B.: Hylan g-f 20: review of its safety and efficacy in the management of joint pain in osteoarthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord.* 20(3) (2010) 55-68.
- [13] Wang Y., Hall S., Hanna F., Wluka A.E., Grant G., Marks P., Feletar M., Cicuttini F.M.: Effects of Hylan G-F 20 supplementation on cartilage preservation detected by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee: a two-year single-blind clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord.* 12 (2011) 195.

References

- [14] Adams M.E., Atkinson H.M., Lussier J.A., Schulz I.J., Siminovich A.K., et al.: The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a Canadian multicenter trial comparing hylan G-F 20 alone, hylan G-F 20 with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and NSAIDs alone. *Osteoarthritis Cartilage* 3 (1995) 213-225.
- [15] Berenbaum F., Grifka J., Cazzaniga S., D'Amato M., Giacovelli G., Chevalier X., Rannou F., Rovati L.C., Maheu E.: A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 71(9) (2012) 1454-1460.
- [16] Aggarwal A., Sempowski I.P.: Hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. Systematic review of the literature. *Can Fam Physician.* 50 (2004) 249-256.
- [17] Pal S., Thuppal S., Reddy K.J., Avasthi S., Aggarwal A., Bansal H., et al.: Long term (1 year) efficacy and safety of single injection 6 ml of Hylan G-F 20 in Indian patients with symptomatic knee OA. *Ann Rheum Dis* 71(3) (2012) 758.
- [18] Wagner J.P., Bonacker G., Wolf H., Frommel M., Leonhardt K., Schulz A. et al.: Long term tolerability and effectiveness of a single injection of 6 ml Hylan G-F 20 in 451 patients with knee osteoarthritis pain. *Ann Rheum Dis* 71(3) (2012) 694.
- [19] Waddell D.D., Bricker D.C.: Total knee replacement delayed with Hylan G-F 20 use in patients with grade IV osteoarthritis. *J Manag Care Pharm.* 13(2) (2007) 113-121.
- [20] Ishijima M., Nakamura T., Shimizu K., Hayashi K., Kikuchi H., Soen S., Omori G., et al.: Intra-articular hyaluronic acid injection versus oral non-steroidal anti-inflammatory drug for the treatment of knee osteoarthritis: a multi-center, randomized, open-label, non-inferiority trial. *Arthritis Res Ther.* 16(1) (2014) R18.
- [21] Huskin J.P., Vandekerckhove B., Delincé P., Verdonk R., Dubuc J.E., Willems S., Hardy P., Blanco F.J., Charrois O., Handelberg F.: Multicentre, prospective, open study to evaluate the safety and efficacy of hylan G-F 20 in knee osteoarthritis subjects presenting with pain following arthroscopic meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 16(8) (2008) 747-752.
- [22] Atay T., Aslan A., Baydar M.L., Ceylan B., Baykal B., Kirdemir V.: The efficacy of low- and high-molecular-weight hyaluronic acid applications after arthroscopic debridement in patients with osteoarthritis of the knee. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 42(4) (2008) 228-233.
- [23] Kahan A., Llieu P.L., Salin L.: Prospective randomized study comparing the medicoeconomic benefits of Hylan GF-20 vs. conventional treatment in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 70(4) (2003) 276-281.
- [24] Hatoum H.T., Fierlinger A.L., Lin S.J., Altman R.D.: Cost-effectiveness analysis of intra-articular injections of a high molecular weight bioengineered hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis knee pain. *J Med Econ.* 17(5) (2014) 326-337.

WŁAŚCIWOŚCI ŚCIERNE STOPÓW Co-Cr W ZAWIESINIE CERAMIKA-SZTUCZNA ŚLINA

JOANNA AUGUSTYN-PIENIAŻEK^{1*}, PAWEŁ KURTYKA²,
JOLANTA STOPKA¹

¹ AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII METALI I INFORMATYKI PRZEMYSŁOWEJ,
KATEDRA METALOZNAWSTWA I METALURGII PROSZKÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

² INSTYTUT TECHNIKI, UNIwersYTET PEDAGOGICZNY,
UL. PODCHORAŻYCH 2, 30-084 KRAKÓW

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

Streszczenie

Publikacja zawiera wyniki badań odporności na ścieranie stopów Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W przeprowadzonych na aparacie Millera. W celu oceny podatności na zużycie ściernie w naturalnych warunkach pracy w/w stopów, badania prowadzono w specjalnie zasy-mulowanym środowisku, składającym się z ceramicznego proszku Dentyna oraz roztworu sztucznej śliny o pH równym 6,7. W ramach badań przeprowadzono obserwacje mikrostruktury przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego stosując kontrast interferencyjno-różniczkowy (kontrast Nomarskiego), wykonano pomiary twardości, zaś powierzchnie po procesie ścierania poddano obserwacji przy wykorzystaniu elektronowej mikroskopii skaningowej. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stopy Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W charakteryzują się wysoką twardością około 400-450 HV10 i minimalnym ubytkiem masy w procesie ścierania. Cechy te świadczą o wysokiej odporności na ścieranie badanych stopów w środowisku proszek ceramiczny-sztuczna ślina. Dodatkowo stwierdzono również, że trzy z badanych stopów Remanium 2001, Colado CC oraz Heraenium P w odróżnieniu od stopu Wironit LA, posiadają przystanki na krzywych ubytku masy w czasie związane z różnicami twardości materiału osnowy β -Co, wydzielęń węglkowych oraz ramion dendrytów. W przypadku stopu Wironit LA obserwowano równomierne zużycie materiału na całej powierzchni. Stwierdzono również, że pomimo różnic w mechanizmach ścierania pomiędzy stopem Wironit LA i Remanium 2001 wielkość ubytku masy jest dla nich na podobnym poziomie, jednak jest ona znacznie niższa niż dla pozostałych dwóch badanych stopów Colado CC ora Heraenium P.

Słowa kluczowe: stopy Co-Cr, testy zużycia ściernego w zawiesinie, protetyka stomatologiczna

[Inżynieria Biomateriałów 127 (2014) 7-15]

Wprowadzenie

Uzębienie człowieka jest bardzo charakterystycznym „systemem”, który w dużym stopniu jest narażony na różne procesy mogące powodować jego niszczenie. Z tego względu od materiałów stosowanych w protetyce stomatologicznej oczekuje się dobrej biogodności, wysokich właściwości mechanicznych oraz odpowiedniej odporności na ścieranie [1-3].

ABRASIVE BEHAVIOUR OF Co-Cr ALLOYS IN THE CERAMIC MATERIAL-ARTIFICIAL SALIVA SUSPENSION

JOANNA AUGUSTYN-PIENIAŻEK^{1*}, PAWEŁ KURTYKA²,
JOLANTA STOPKA¹

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF METALS ENGINEERING AND INDUSTRIAL COMPUTER
SCIENCE, DEPARTMENT OF PHYSICAL AND POWDER METALLURGY,
MICKIEWICZA Av. 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

² INSTITUTE OF TECHNOLOGY, PEDAGOGICAL UNIVERSITY OF KRAKOW,
PODCHORAŻYCH 2 STREET, 30-084 KRAKOW, POLAND

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

Abstract

The publication contains the results of the abrasion resistance tests carried out on Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys using Miller apparatus. To assess the susceptibility to abrasive wear of the above mentioned alloys under natural operating conditions, tests were carried out in a specially simulated environment, consisting of a ceramic Dentine powder and artificial saliva solution with pH of 6.7. The scope of studies included the examinations of microstructure performed by light microscopy using differential interference contrast (Nomarski contrast), measurements of hardness, and SEM examinations of surfaces after the abrasion process. The results of these studies enabled formulating the conclusion that alloys from the Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W systems are characterised by high hardness of about 400-450 HV10 and minimum weight loss in the process of abrasion. These features prove high abrasive wear resistance of the examined alloys in the environment of ceramic powder and artificial saliva. Additionally, it was also found that three of the tested alloys, i.e. Remanium 2001, Colado CC and Heraenium P, unlike the Wironit LA alloy, show time-related arrests on the weight loss curves caused by different hardness values of the β -Co matrix, carbide precipitates and dendrite arms. The Wironit LA alloy was observed to wear evenly across the whole surface. It was also found that, despite differences in abrasion mechanism operating in the Wironit LA and Remanium 2001 alloys, the magnitude of weight loss has been similar and, at the same time, much lower than for the other two alloys tested, i.e. Colado CC and Heraenium P.

Keywords: Co-Cr alloys, abrasive wear tests in suspension, prosthodontics

[Engineering of Biomaterials 127 (2014) 7-15]

Introduction

Human teeth form a very specific “system” largely affected by various processes that may cause its destruction. For this reason, the materials used in dental prosthetics must have good biocompatibility, high mechanical properties and abrasion resistance [1-3].

Własności mechaniczne oraz odporność korozyjna tych stopów stanowiące ich podstawowe zalety wynikają głównie ze składu chemicznego oraz struktury, która z kolei jest uzależniona od rodzaju technologii i warunków wytwarzania [4].

Ze względu na zastosowanie, odlewnicze stopy z rodziny Co-Cr można podzielić na dwie podstawowe grupy. Pierwsza, to materiały, które wykorzystuje się w chirurgii narządów ruchu oraz druga grupa, to stopy z przeznaczeniem głównie w pracowniach protetyczno-stomatologicznych do wytwarzania implantów protetycznych, protez szkieletowych czy odbudów metalowych pod ceramiczne korony [4,5].

Stopy Co-Cr-Mo stanowią odlewnicze stopy typu Vitalium o zawartości węgla do 0,35% [6]. Zawartości chromu i molibdenu w stopach Vitalium są tak dobrane, aby osnowę stopów stanowił β -Co. Obecność węglotwórczych pierwiastków stopowych przy obecności węgla spowodowało tworzenie się w tych stopach podczas obróbki cieplnej węglków typu $M_{23}C_6$ [6-8]. Według Taylora i Waterhausa [9] w strukturze tych stopów powstają także pierwotne węgliki M_7C_3 , natomiast według innych naukowców Clemowa i Daniella [10] również węgliki M_6C . Stopy Co-Cr-Mo są bardzo podatne na umocnienie, dlatego do odlewania stosuje się precyzyjną metodę – technikę traconego wosku [2,6].

Drugą grupą stopów na osnowie kobaltu o zastosowaniu stomatologicznym stanowią stopy Co-Cr-Mo-W [6]. Skład chemiczny tych stopów obejmuje dodatkowo wolfram. Stopy te cechują się niższą grubością warstwy utlenionej powstającej w procesie wytwarzania, co sprzyja tworzeniu trwałych połączeń z ceramiką. Z tego względu, stopy te wykorzystuje się do napalania ceramiki bezpośrednio na metalu lub do pokrywania akrylem. Stopy Co-Cr-Mo-W są przeznaczone do wykonywania konstrukcji szkieletowych, koron i mostów [6,8].

Podstawowym problemem podczas ich stosowania jest konieczność ich bezpośredniego przetworzenia przez końcowego użytkownika. Wynika z tego, że nawet najlepiej przygotowane komercyjne stopy, w których producent zadbał o odpowiednią strukturę i właściwości użytkowe i tak muszą zostać przetworzone – przetopione, co powoduje całkowitą zmianę ich struktury, a co za tym idzie i właściwości. Prowadzi to w efekcie do licznych problemów natury eksploatacyjnej. Możliwa jest bowiem sytuacja, w której stop komercyjny, ze względu na sposób przetopienia i odlania, posiada właściwości użytkowe znacznie gorsze od deklarowanych przez producenta [11,12].

Odrębnym zagadnieniem, jest również metodyka badania stopów Co-Cr, w której niejednokrotnie nie uwzględnia się dodatkowych czynników mogących istotnie wpływać na właściwości badanego materiału, np. środowiska pracy, tworzyw współpracujących etc. Stąd też, w pracy podjęto próbę określenia wybranych właściwości tribologicznych oraz mechanicznych komercyjnych stopów Co-Cr po odlewaniu w wykorzystaniem techniki traconego wosku oraz zaprojektowanego cyklu technologicznego w warunkach pracy w symulowanym środowisku.

Podstawowym celem niniejszej pracy było porównanie zużycia ściernego, jego mechanizmów oraz wybranych właściwości mechanicznych, czterech wybranych stopów na bazie kobaltu z grupy Co-Cr po procesie odlewnia techniki traconego wosku. Badania prowadzono pod kątem ich zastosowania w protetyce stomatologicznej, wykorzystując symulowane środowisko w postaci zawiesiny Dentyna-sztuczna ślina.

The mechanical properties and corrosion resistance of these alloys, which are their main advantages, are inherently related with the chemical composition and structure, the latter one being in turn dependent on the type of technology and manufacturing conditions [4].

In terms of their application, foundry alloys from the Co-Cr family can be divided into two main groups. The first group includes the materials that are used in orthopedics, while the second group consists of alloys used in prosthetic-dental laboratories for the production of prosthetic implants, frame prostheses or metal restorations in ceramic crowns [4,5].

Alloys from the Co-Cr-Mo system are casting Vitalium-type alloys with carbon content of up to 0.35% [6]. The content of chromium and molybdenum in Vitalium alloys is selected in such a way as to make the β -Co phase play the role of alloy matrix. The addition of carbide-forming alloying elements to these alloys in the presence of carbon results in the formation of $M_{23}C_6$ type carbides during heat treatment [6-8]. According to Taylor and Waterhaus [9], the structure of these alloys may also contain the primary M_7C_3 carbides, while according to other researchers, e.g. Daniell and Clemow [10], M_6C carbides are additionally formed. Co-Cr-Mo alloys are very susceptible to hardening, and therefore for casting, high-precision processes, such as e.g. the lost wax process, are usually the technology of choice [2,6].

The second group of cobalt-based alloys for dental applications includes Co-Cr-Mo-W alloys [6]. The chemical composition of these alloys is additionally enriched with tungsten. They have lower thickness of the oxidised layer generated in the manufacturing process, which helps to create a stable bond with the ceramic material and makes these alloys suitable for direct application of ceramic or acrylic coatings. Co-Cr-Mo-W alloys are used to make frameworks, crowns and bridges [6,8].

The main problem in their practical application is the fact that they must undergo final processing performed by the end user. Hence it follows that even the best-prepared commercial alloys, in the case of which the manufacturer did his best to provide the required structure and properties, must be further processed, i.e. remelted, which will cause a complete change in their structure and thus also in their properties. Eventually this leads to a number of operational problems, since the situation is possible in which a commercial alloy, due to the adopted method of remelting and casting, will have the properties much inferior to those declared by the producer [11,12].

A separate issue is the research methodology applied to Co-Cr alloys, which often does not take into account some additional factors that can significantly affect the properties of the examined material, to mention as an example the working environment, mate materials, etc. Therefore, in this study an attempt has been made to determine the selected mechanical and tribological properties of commercial Co-Cr alloys cast by the lost wax process in a pre-established production cycle and operating under the conditions of simulated environment.

The primary objective of the study was to compare the abrasive wear and its mechanism, as well as the selected mechanical properties of four cobalt-based alloys from the Co-Cr alloy family, cast by the lost wax process. Another aim of the study was to confirm the applicability of these alloys in dental prosthetics, using simulated "natural" environment in the form of a Dentin-artificial saliva suspension.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły cztery wybrane stopy na osnowie kobaltu stosowane do wykonywania protez szkieletowych, prac kombinowanych, implantów oraz podbudowy metalowej pod ceramikę. Skład chemiczny badanych stopów Co-Cr-Mo oraz Co-Cr-Mo-W przedstawiono w TABELI 1.

Materials and Methods

Tests were carried out on four selected cobalt-based alloys used to make prostheses, combined work, implants and metal framework for porcelain. The chemical composition of the tested Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys is given in TABLE 1.

**TABELA 1. Skład chemiczny wybranych stopów Co-Cr, % wag. Zawartość węgla była niższa niż 0.35%.
TABLE 1. Chemical composition of selected Co-Cr alloys, wt%. Carbon content was lower than 0.35%.**

Pierwiastki Elements (% wag./wt.%)	Nazwa handlowa / Trade name			
	Wironit LA	Remanium 2001	Colado CC	Heraenium P
Co	63.5	63.0	59.0	59.0
Cr	29.0	23.0	25.5	25.0
Mo	5.0	7.3	5.5	4.0
Si	1.2	1.6	-	1.0
W	-	4.3	5.0	10.0
Ga	-	-	3.2	-
Mn	-	-	-	0.8

Próbki do badań zostały odlane techniką traconego wosku. Pierwszym etapem procesu odlewania było przygotowanie dla każdego stopu modeli woskowych o określonych wymiarach: 25,4×12×(9-11) mm (wymiarów próbek wymaganych do przeprowadzenia próby procesu ścierania przy wykorzystaniu aparatu Millera). Kolejnym etapem było umieszczenie modeli woskowych w pierścieniu, który zalano masą ogniotrwałą na bazie fosforanów. Po zalaniu pierścienia włożono do komory ciśnieniowej i poddano ciśnieniu 0,4 MPa przez czas 20 minut celem prawidłowego związania się masy ogniotrwałej. Gdy masa uległa związaniu włożono powstały tygiel do pieca i rozpoczęto proces nagrzewania z prędkością 7°C/min. Wykonano dwa przystanki izotermiczne podczas nagrzewania. Pierwszy, przy temperaturze 250°C przez czas 20 minut - następuje odparowanie wody z pierścienia odlewniczego i wyparowanie wosku. Drugi postój zastosowano przy temperaturze 600°C i takim samym czasie tj. 20 minut kiedy to zachodzi przemiana krzemionki. Zakończenie procesu nastąpiło przy temperaturze 950°C. Kolejnym etapem pracy było przeprowadzenie procesu odlewania, w celu tym wykorzystano piec Vulcan 3-550. Po odlaniu, próbki wyciągnięto z pieca i chłodzono na wolnym powietrzu. Kolejnym etapem pracy było usunięcie masy ogniotrwałej i piaskowanie mechaniczne na maszynie Ecoblast Kombi piaskiem o ziarnistości 200 µm, przy ciśnieniu 0,6 MPa. Ostatnim etapem przygotowania próbek było mechaniczne usunięcie kanałów wlewowych.

Badania twardości prowadzono metodą Vickersa. Twardość została zbadana przy pomocy twardościomierza ZWICK/ZHU 187.5, przy obciążeniu 100 N (HV10). Testy prowadzono w losowo wybranych miejscach odlewu, a liczba pomiarów na próbce wynosiła każdorazowo 10.

Obserwacje mikrostruktury prowadzono przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego Olympus GX51 z kontrastem Nomarskiego i LEICA DM 4000. Powierzchnie próbek po kolejnych procesach zużycia ściernego poddano obserwacjom przy wykorzystaniu skaningowej mikroskopii elektronowej z użyciem mikroskopu HITACHI S-3500N.

Celem przygotowania materiałów do obserwacji mikrostruktury badanych stopów Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W próbki o wymiarach 10×15×5 mm poddano obróbce mechanicznej, która składała się z następujących bezpośrednio po sobie procesów: szlifowania mechanicznego na papierach ściernych o gradacji: 400-4000 oraz polerowania mechanicznego.

Test specimens were cast by the lost wax technique. The first step in the casting process was to prepare for each alloy the wax patterns of predetermined 25.4×12×(9-11) mm dimensions (the dimensions of samples required in the Miller abrasion test). The next step consisted in placing the wax patterns in rings and pouring them with a refractory mixture based on phosphates. After pouring, the rings were placed in a pressure chamber and subjected to the effect of a pressure of 0.4 MPa operating for a period of 20 min to obtain proper binding of the refractory material. When the mixture was bonded, thus formed crucibles were inserted into the furnace and the process of heating at a rate of 7°C/min was started. Two isothermal stops were made during heating - first, at a temperature of 250°C for 20 min, mainly to let water and wax evaporate from the casting ring. The second stop was made at a temperature of 600°C and for the same time of 20 min, when the transformation of silica took place. The process was completed at a temperature of 950°C. The next step in the tests was the execution of the casting process. For this purpose, a Vulcan 3-550 furnace was used. After casting, specimens were taken out from the furnace and cooled in the open air. The next step was the removal of a refractory mixture and mechanical blasting of the specimens with sand of 200 µm grain size. The operation of sand blasting was performed in an Ecoblast Kombi machine at a pressure of 0.6 MPa. The last step in the preparation of specimens was mechanical de-gating.

Hardness was measured by the Vickers method, using a ZWICK/ZHU 187.5 hardness tester under a load of 100 N (HV10). Hardness measurements were taken at places randomly selected on the casting. Each time, ten measurements were taken on each of the specimens.

Microstructure was examined using an Olympus GX51 light microscope with Nomarski contrast and a LEICA DM 4000. The specimen surfaces after the subsequent processes of abrasion were examined by SEM under a HITACHI S-3500N microscope.

To prepare samples of the Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys for microstructure examinations, the specimens with 10×15×5 mm dimensions were subjected to mechanical treatment, which consisted in the repeated process of mechanical grinding with a 400-4000 grit abrasive paper and polishing.

W celu ujawnienia mikrostruktury badanych materiałów, zglądy metalograficzne zostały poddane trawieniu chemicznemu, przy zastosowaniu odczynnika trawiącego: 1 cz. HNO_3 + 3 cz. HCl .

Badania zużycia ściernego przeprowadzono na aparacie Millera [13] zgodnie z procedurą zawartą w normach ASTM. Stosowany jednostkowy nacisk na próbkę wynosił około 0,07 MPa, a obciążenie całkowite próbki wynosiło 22,24 N. Prędkość ruchu próbki była stała i wynosiła 0,254 m/s natomiast częstotliwość ruchu była równa 48 min^{-1} .

W związku z tym, że badane stopy mają zastosowanie stomatologiczne, w pracy podjęto próbę zasymulowania warunków naturalnych pracy stopu. Z tego względu badania ścierania prowadzono w mieszaninie proszku ceramicznego DB1 (Dentyna) firmy CCS (Compact Ceramic System) [14] i sztucznej śliny. Skład roztworu sztucznej śliny był następujący [15]: NaCl 0,7 g/dm^3 , KCl 1,7 g/dm^3 , KH_2PO_4 0,2 g/dm^3 , NaHCO_3 1,5 g/dm^3 , NaHCO_3 1,5 g/dm^3 , Na_2HPO_4 0,26 g/dm^3 , KSCN 0,33 g/dm^3 , a jej pH wynosiło 6,7. Zawartości poszczególnych składników sztucznej śliny podano w przeliczeniu na 1 dm^3 wody. W przypadku badań prowadzonych na stopach Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W proces ścierania obejmował cykle: 2, 4, 6, 8, 12 i 16 h. Po każdym cyklu próbki płukano w płuczce ultradźwiękowej w cyklach 3 x po 3 min w etanolu. Następnie poddawano je procesowi suszenia w strumieniu powietrza w temperaturze 50°C przez 10 min oraz ważono na wadze analitycznej RADWAG AS 220/C/2.

Wyniki i dyskusja

Badane stopy podlegały procesowi przetopienia, w związku z tym przed ich dalszym badaniem należało określić jak wygląda ich mikrostruktura po odlaniu. Stąd też w pierwszej kolejności wykonano obserwacje mikrostruktury przy wykorzystaniu mikroskopu świetlnego. Otrzymane wyniki w postaci typowych obrazów mikrostruktury wybranych stopów Co-Cr, zaprezentowano na RYS. 1.

Dla wszystkich obserwowanych materiałów stwierdzono występowanie charakterystycznej, typowej dla odlewanych stopów struktury dendrytycznej, przy czym pomiędzy badanymi stopami występowały jedynie niewielkie różnice strukturalne dotyczące wielkości i rozkładu dendrytów. Mikrostruktura składa się z austenitycznej osnowy, którą stanowi roztwór stały kobaltu oraz chromu w rdzeniowej strukturze dendrytycznej. Na podstawie danych literaturowych [6,16-18] przyjęto, że głównymi wydzieleniami węglowymi, które występują w tego rodzaju stopach są fazy węglików typu M_{23}C_6 , które rozmieszczone są na granicach ziaren oraz w przestrzeniach międzydendrytycznych, będące głównym powodem umocnienia materiału.

Mając na względzie wyniki obserwacji mikrostruktury, jak i informacje literaturowe dotyczące możliwych niejednorodności chemicznych stopu, wykonano w losowo wybranych miejscach na wszystkich płaszczynach odlewu badania twardości HV10. Celem badań było określenie stopnia twardości wybranych stopów po odlaniu w odniesieniu do stopów komercyjnych. Na podstawie otrzymanych wyników pomiarów obliczono wartość średnią twardości stopów po odlaniu oraz odchylenie standardowe. Podsumowanie wyników badań zaprezentowano w TABELI 2.

Najwyższą twardość odnotowano dla stopu Wironit LA, najniższą zaś dla stopu Colado CC. Skład chemiczny stopów Co-Cr warunkuje wielofazową budowę stopów [17]. Strukturę roztworu stałego chromu, molibdenu bądź wolframu w kobaltcie, umacniają dyspersyjne wydzielenia twardych węglików (M_{23}C_6), a ich kształt, dyspersja i rozmieszczenie decydują w dużej mierze o twardości stopu [4].

To reveal the microstructure of the tested materials, the metallographic sections were subjected to chemical etching using the etching reagent composed of 1 part HNO_3 + 3 parts HCl .

Studies of the abrasive wear were carried out on Miller apparatus [13] in accordance with the procedure set out by ASTM standard. The unit pressure applied on the sample was 0.07 MPa, and the total load on sample was 22.24 N. The speed of the sample movement was constant and set at 0254 m/s, while the frequency of sample movement was 48 min^{-1} .

In view of the fact that the tested alloys are to be used in dental applications, an attempt has been made in the studies to create the test conditions resembling the natural conditions of alloy operation. For this reason, the abrasion tests were carried out in a mixture of DB1 (Dentin) ceramic powder made by CCS (Compact Ceramic System) [14] and artificial saliva. The composition of artificial saliva solution was as follows [15]: NaCl 0.7 g/dm^3 , KCl 1.7 g/dm^3 , KH_2PO_4 0.2 g/dm^3 , NaHCO_3 1.5 g/dm^3 , NaHCO_3 1.5 g/dm^3 , Na_2HPO_4 0.26 g/dm^3 , KSCN 0.33 g/dm^3 ; the value of pH was 6.7. The content of individual components of the artificial saliva was calculated in terms of 1 dm^3 of water. In tests conducted on the Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys, the abrasion process included the cycles of 2, 4, 6, 8, 12 and 16 h. After each cycle, samples were washed in an ultrasonic cleaner in ethanol in cycles of 3 x 3 min. Then the samples were subjected to a drying process in the stream of air at a temperature of 50°C for 10 min and were weighed on a RADWAG AS 220/C/2 analytical balance.

Results and discussion

The alloys tested had to be remelted, and therefore, before continuation of the studies, it was necessary to determine their as-cast microstructure. Hence, the first step included microstructure examinations by light microscopy. The results obtained in the form of typical microstructure images of the selected Co-Cr alloys are presented in FIG. 1.

In all the examined materials, the occurrence of a dendritic structure typical of cast alloys has been observed (FIG. 1). At the same time, only minor structural differences were traced in the examined alloys, mainly regarding the size and distribution of dendrites. The microstructure consisted of an austenitic matrix which was a solid solution of cobalt and chromium in the core dendritic structure. Based on literature data [6,16-18] it has been assumed that the main carbide precipitates that occur in alloys of this type are the M_{23}C_6 carbide phases, arranged at the grain boundaries and in the interdendritic spaces. These phases are mainly responsible for hardening of the material.

Considering the results of microstructure examinations and information given in the reference literature on possible chemical heterogeneity of the alloys, HV10 hardness measurements were taken at randomly selected places on all casting planes. The aim of the study was to determine the degree of hardness in selected cast alloys compared with commercial stock. Based on the obtained results of measurements, the mean value of alloy hardness after casting was calculated along with the standard deviation. TABLE 2 gives summary of the test results.

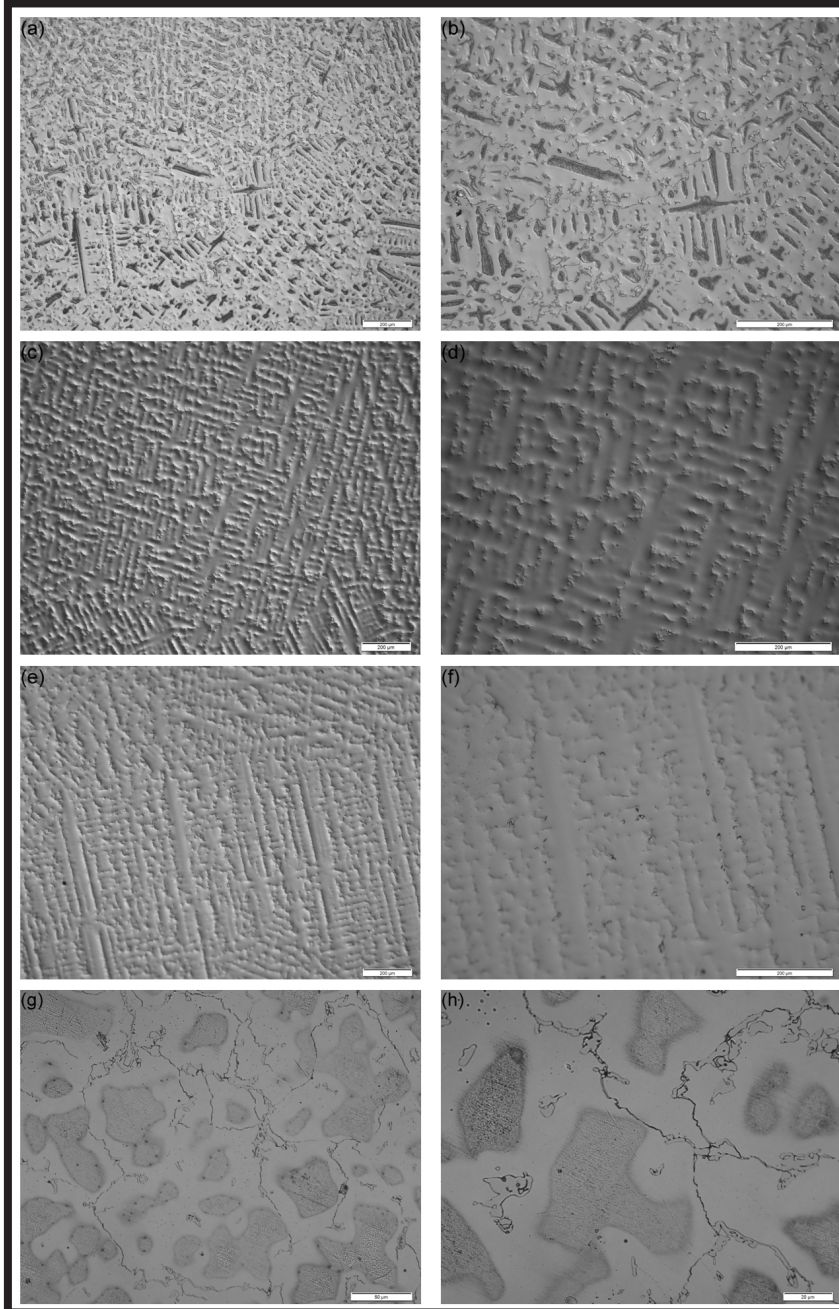
The highest hardness was reported for the Wironit LA, alloy, while the lowest values were found in Colado CC. The chemical composition of Co-Cr alloys conditions their multi-phase structure [17]. The structure of the solid solution of chromium, molybdenum or tungsten in cobalt is strengthened by the dispersed precipitates of hard carbides (M_{23}C_6), while the shape, dispersion and distribution of these carbides largely determine the alloy hardness [4].

Należy podkreślić, że otrzymane materiały w każdym przypadku posiadały wartość twardości większą od deklarowanych przez producenta przynajmniej o 10% (TABELA 2).

Mając na względzie fakt, że materiał twardszy będzie również posiadał większą odporność na powstawanie rys oraz zużycie, należy się spodziewać znacznej poprawy właściwości tribologicznych [19,25]. Dodatkowo w literaturze sygnalizowano również, że wysoka twardość stopu zapewnia odporność na mechaniczne uszkodzenia, jakie mogą wystąpić podczas niektórych procedur w leczeniu ortodontycznym [20-24].

It should be emphasized that in each case the materials obtained had the hardness values higher than those declared by the manufacturer (by even as much as 10%) (TABLE 2).

Given the fact that the material with higher hardness can be expected to offer also higher resistance to scratching and abrasive wear, a significant improvement in tribological properties has been predicted [19,25]. Technical literature also mentions the fact that high hardness of the alloy provides resistance to mechanical damage that may occur during certain procedures in orthodontic treatment [20-24].

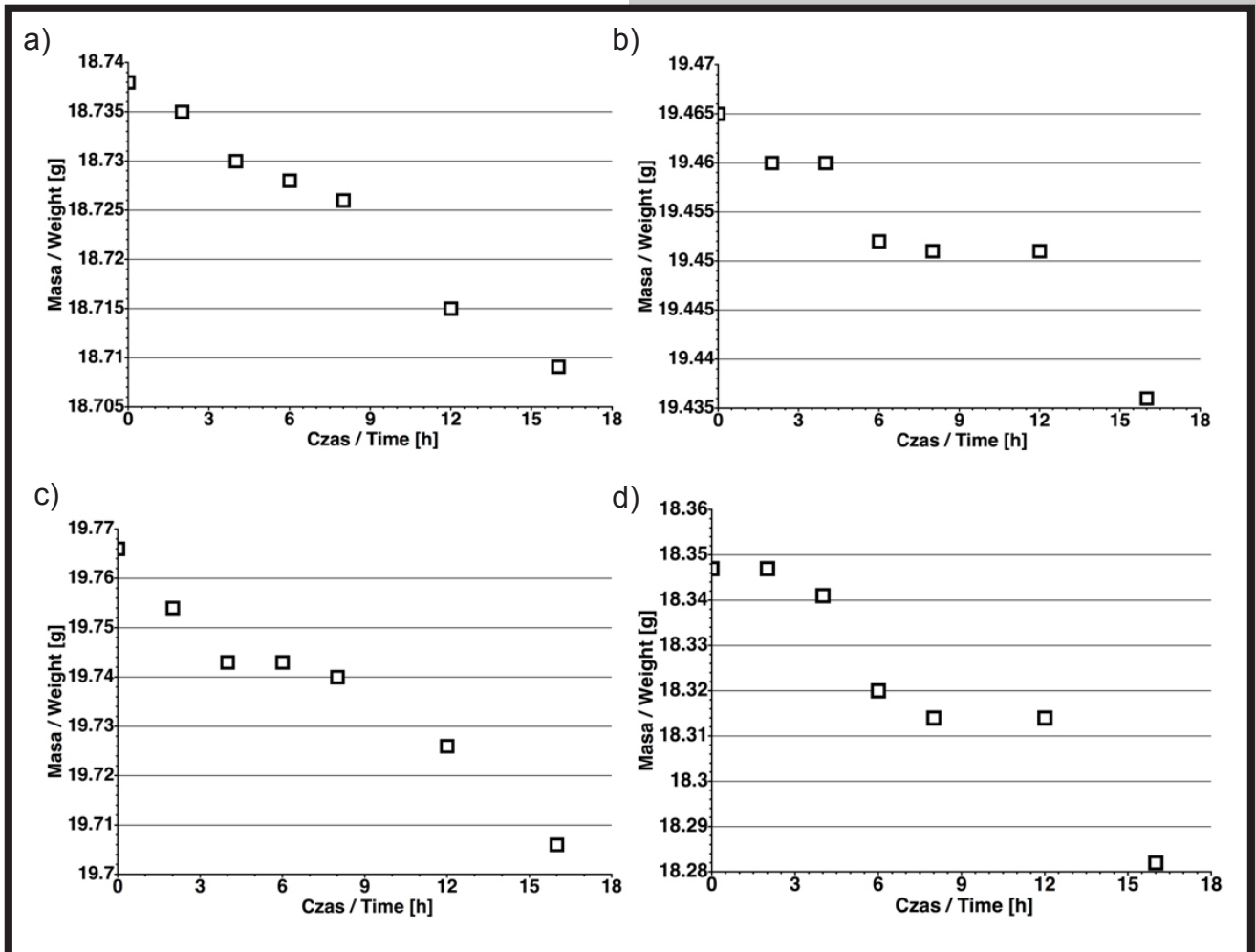


RYS. 1. Przykładowe mikrostruktury stopów: Wironit LA (a, b), Remanium 2001 (c, d), Colado CC (e, f) i Heraenium P (g, h) po procesie odlewania.
FIG. 1. Examples of as-cast microstructures obtained in alloys: Wironit LA (a, b), Remanium 2001 (c, d), Colado CC (e, f) i Heraenium P (g, h).

TABELA 2. Wyniki twardości HV10 stopów Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W.
TABLE 2. Hardness HV10 of the Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys.

	Rodzaj stopu / Type of alloy			
	Wironit LA	Remanium 2001	Colado CC	Heraenium P
Twardość HV10*	360.0	336.0	360.0	275.0
\bar{x}	438.9	409.5	403.5	412.4
$s(\bar{x})$	31.3	20.8	18.4	21.9

*Twardość deklarowana przez producenta / Hardness declared by the manufacturer



RYS. 2. Ubytek masy stopów poddanych zużyciu ściernemu przy wykorzystaniu aparatu Millera w środowisku proszek ceramiczny+sztuczna ślina: a) Wironit LA, b) Remanium 2001, c) Colado CC, d) Heraenium P.
FIG. 2. Weight loss of alloys subjected to abrasive wear in Miller apparatus in an environment of ceramic powder + artificial saliva: a) Wironit LA, b) Remanium 2001, c) Colado CC, d) Heraenium P.

Dalsze badania prowadzono na aparacie Millera, zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Wyniki przeprowadzonych testów zużycia ściernego badanych stopów Co-Cr-Mo i Co-Cr-Mo-W aparatem Millera, w środowisku proszek ceramiczny + sztuczna ślina zostały przedstawione na RYS. 2.

Analiza uzyskanych wyników badań wskazuje, że w przypadku trzech badanych stopów Remanium 2001, Colado CC oraz Heraenium P proces zużycia ściernego nie jest równomierny. Obserwowano na krzywych zmian masy w funkcji czasu (RYS. 2), przystanki świadczące o występowaniu czynników zmniejszających zużycie. Zjawisko to najlepiej widoczne jest dla stopu Remanium 2001, przy którym obserwowane są aż dwa przystanki na krzywych zużycia. Natomiast w przypadku stopu Wironit LA obserwowano praktycznie liniową zależność zmiany masy w czasie. Różnica pomiędzy otrzymanymi wynikami dla stopu Wironit LA i pozostałymi, była również obserwowana we wcześniejszych badaniach prowadzonych z udziałem SiC, jak i ścierniwa [25]. Obserwowany efekt zmniejszania zużycia jest związany z budową materiału, jego strukturą dendrytyczną oraz wydzieleniami węglowymi znajdującymi się w mikrostrukturze. Ilość przystanków na krzywych czy też ich długość są bezpośrednio zależne od różnic twardości pomiędzy osnową materiałów (β -Co) oraz dendrytów, a także lokalizacją i ilością węglików w przestrzeniach międzidendrytycznych [18].

Further studies were performed on Miller apparatus in accordance with the procedure described above. The results of abrasive wear tests carried out with Miller apparatus on the investigated Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys in an environment of ceramic powder + artificial saliva are shown in FIG. 2.

Analysis of the results indicates that in the case of the three alloys studied, i.e. Remanium 2001, Colado CC and Heraenium P, the wear process is not uniform. Curves show the time-related weight changes (FIG. 2) and arrests which prove the presence of factors reducing the rate of wear. This phenomenon is best seen in Remanium 2001 alloy, in the case of which even two arrests occur on the wear curves. In contrast, the Wironit LA alloy shows practically linear relationship in weight changes over time. The difference between the results obtained for the Wironit LA alloy and other alloys was also observed in previous studies conducted with the use of SiC as an abrasive agent [25]. The observed effect of reduced wear is associated with the alloy structure, in prevailing part of a dendritic character and with carbide precipitates present there. The number of arrests on the wear curves and their length directly result from differences in the hardness of the matrix (β -Co) and dendrites, and also from the location and amount of carbides in the interdendritic spaces [18].

W ten sposób należy tłumaczyć wyniki ścierania stopu Wironit LA, w którym różnice twardości poszczególnych składników strukturalnych oraz ich lokalizacja wymuszają równomierne zużycie materiału [25]. W pozostałych przypadkach, następuje jednak w pierwszej kolejności wycieranie miękkiej osnowy, a następnie po odsłonięciu ramion dendrytów do odpowiedniej wysokości ich wykruszanie/ściananie.

Wydaje się, że w zależności od składu chemicznego dendrytów oraz udziału węglików w obszarach międzydendrytycznych proces ten następuje szybciej lub wolniej, co zaobserwowano na przykładzie stopów Remanium 2001 oraz Colado CC i Heraenium P. Jednak kwestia ta wymaga przeprowadzenia dodatkowych szczegółowych badań, które będą tematem kolejnej przygotowywanej pracy.

W pierwszym przypadku wykruszanie/ściananie ramion dendrytów następuje częściej, co potwierdzają dwa przystanki na krzywych (RYS. 2). Natomiast w przypadku dwóch dalszych stopów proces wycierania osnowy jest znacznie intensywniejszy oraz dłuższy i trwa od około 6-12 h.

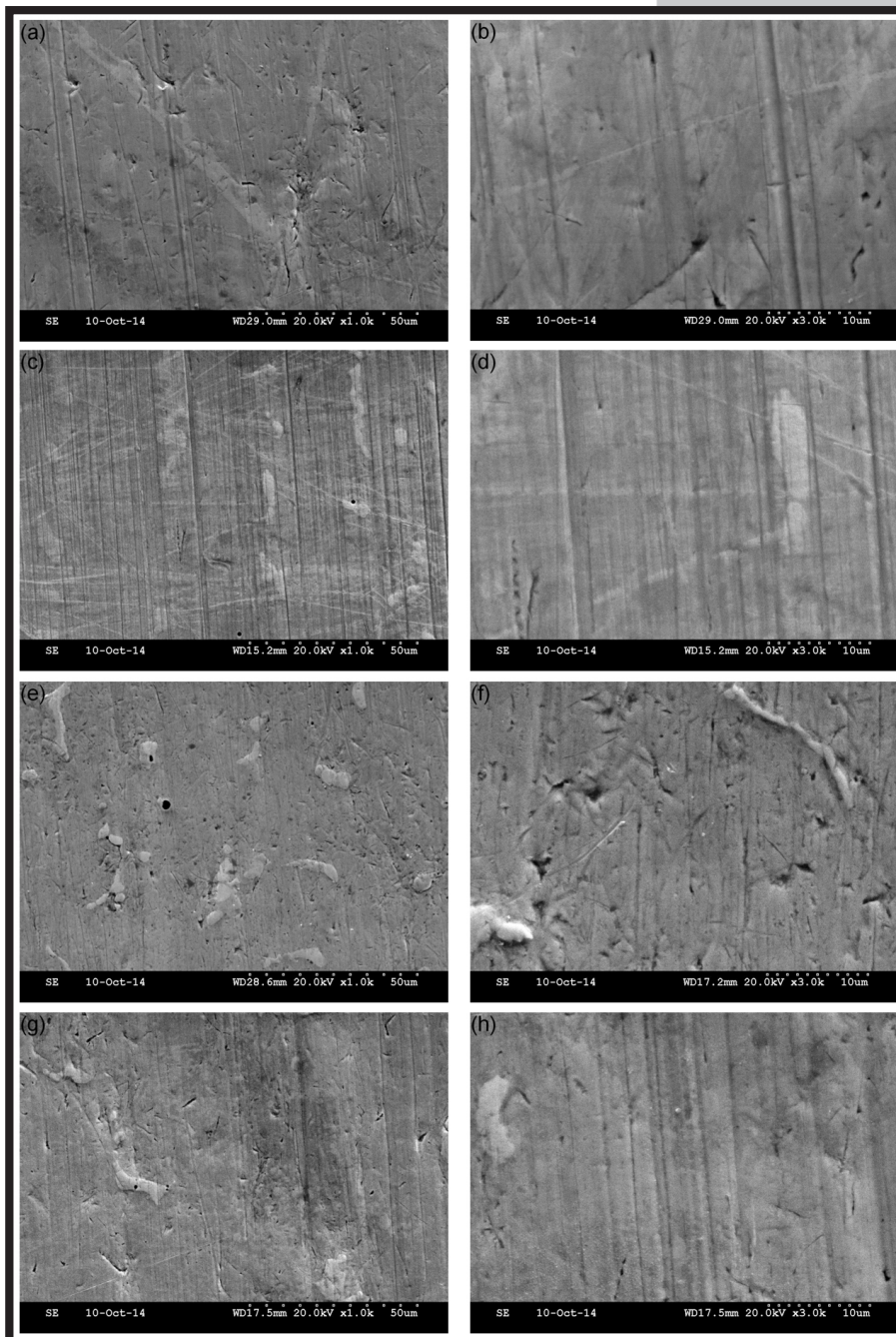
Przykładowe obrazy morfologii powierzchni po ścieraniu (16 h) przedstawiono na RYS. 3.

This explains the results obtained in the abrasion test for Wironit LA, where differences in the hardness of individual structural components and their location forced a uniform wear of the material. In other cases, however, the wear affected the soft matrix, first, and then, upon the exposure of dendrite arms to an appropriate height, it caused their chipping and shear.

It seems, that depending on the chemical composition of the dendrites and carbides content in the interdendritic spaces, this process occurs faster or slower as observed for Remanium 2001, Colado CC and Heraenium P alloys. However, this issue requires more detailed studies, which will be the subject of the next upcoming work.

In the first case, chipping / shear of the dendrite arms occurs more frequently as evidenced by two arrests on the curves (FIG. 2). In the case of two other alloys, the wear of the matrix is much more intense; it takes a longer time and lasts about 6-12 h.

Representative images of the surface structure after 16 h of abrasion are shown in FIG. 3.



RYS. 3. Wybrane obrazy powierzchni badanych stopów Co-Cr po 16 h cyklu procesu ścierania przy wykorzystaniu aparatu Millera: Wironit LA (a, b), Remanium 2001 (c, d), Colado CC (e, f), Heraenium P (g, h).

FIG. 3. Selected images of the surface of the tested Co-Cr alloys after the 16 hour-lasting abrasion process in Miller apparatus: Wironit LA (a, b), Remanium 2001 (c, d), Colado CC (e, f), Heraenium P (g, h).

Analizując zużycie ściernie stopów Co-Cr podczas testów metodą Millera stwierdzono, że podstawowym mechanizmem ścierania był proces mikrorysowania powierzchni. Przesuwający się element ścierny (proszek ceramiki + sztuczna ślina) tworzył rysy na skutek oddziaływania cząstek proszku z powierzchnią stopów poprzez częściowe wykrawanie i w niektórych przypadkach przemieszczanie go na boki (RYS. 3). Na mikrofotografiach wyraźnie widać, szczególnie dla stopów Colado CC (RYS. 3b) oraz Heraenium P (RYS. 3c) nierównomierne zużycie powierzchni z wystającymi ramionami dendrytów, przy czym w przypadku stopu Colado CC obserwowanym mechanizmem ścierania jest mikrorysowanie, natomiast dla stopu Heraenium P dodatkowo obserwuje się efekty mikrobrzdowania. W przypadku stopu Remanium 2001 dominującym mechanizmem ścierania jest mikrorysowanie, jednak daje się zaobserwować również efekty pochodzące od mikrobrzdowania podobnie, jak dla stopu Heraenium P. W stopie Wironit LA obserwowano podobną sytuację jak w poprzednim przypadku z tym, że efekty mikrobrzdowania nie były praktycznie widoczne, jak również nie obserwowano wystających ramion dendrytów na ścieranej powierzchni. Świadczy to o równomiernym ścieraniu się materiału.

Osobnym zagadnieniem jest ilościowa analiza otrzymanych efektów ścierania. W tym przypadku dla stopów Wironit LA i Remanium 2001 obserwowano zbliżone wartości zużycia po 16 h na poziomie ubytku 0,035 g, przy czym różnice pomiędzy nimi są w obszarze błędów pomiarowych. W przypadku pozostałych badanych stopów wielkości ubytku masy po 16 h kształtowały się na poziomie około 0,07 g. Warto zauważyć, że w przypadku trzech badanych stopów poza Wironitem LA przystanek na krzywej ścierania lokował się na poziomie połowy wartości całkowitego ubytku masy czyli dla Remanium 2001 około 0,015 g, natomiast dla pozostałych stopów na około 0,03 g.

Różnice w twardościach badanych stopów, morfologii powierzchni po ścieraniu oraz ubytków masy mogą wynikać z możliwości występowania faz międzymetalicznych [17] o zwiększonej twardości w stosunku do węglików tworzących się w obszarach międzydendrytycznych [25]. Udział procentowy pierwiastków stopowych wchodzących w skład badanych stopów determinuje ilość oraz jakość tworzących się faz międzymetalicznych oraz samych węglików, co istotnie wpływa na otrzymane wyniki badań.

Wnioski

Biorąc pod uwagę otrzymane ciekawe wyniki oraz niewiele danych literaturowych dotyczących tych stopów, jak również bezpośrednie zapotrzebowanie na nie ze strony sektora stomatologicznego, wydaje się celowe kontynuowanie dalszych badań w tym kierunku. W szczególności należy określić jaki wpływ na badane stopy będzie miała zmiana środowiska pracy, wielkości elementów trących oraz ich charakteru. Nadto, określenie szczegółowego wpływu wydzielań węglkowych na przebieg procesu ścierania wydaje się niezwykle istotny.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. Wszystkie badane stopy cechują się twardością na poziomie 403-439 HV10, co jest wynikiem lepszym o ponad 10% od tych jakie deklarują producenci stopów komercyjnych.

2. We wszystkich badanych przypadkach głównym mechanizmem działającym podczas testu było mikrorysowanie, przy czym w przypadku stopów Remanium 2001, Wironit LA oraz Heraenium P obserwowany jest również udział mechanizmu ścierania w postaci mikrobrzdowania.

Analysing the course of wear in Co-Cr alloys during Miller test it was stated that the primary abrasion mechanism was microscratching of the surface. The advancing abrasive element (ceramic powder + artificial saliva) made scratches on the surface due to the interaction of powder particles with the alloy surface, resulting in partial cutting out of the material and, in some cases, moving it sideways (FIG. 3). The microphotographs clearly show, particularly for Colado CC and Heraenium P alloys (FIGs. 3b and 3c, respectively), uneven surface wear with dendrites arms protruding. In the case of Colado CC alloy, the prevailing abrasive mechanism is microscratching, while in Heraenium P alloy additional effects of microfurrowing are observed. In the case of Remanium 2001 alloy, the dominant abrasion mechanism is microscratching, but some effects related with microfurrowing are also visible, just as in the case of Heraenium P alloy. In Wironit LA, the situation is similar to the previous case, except that the microfurrowing effects are practically not visible, neither are visible the dendrite arms protruding from the surface exposed to abrasion, which proves a uniform abrasive wear of this material.

Another issue is the quantitative analysis of the obtained results of abrasion. In this case, similar values of the abrasive wear were observed for the Wironit LA and Remanium 2001 alloys after 16 h wear test with the weight loss of 0.035 g, the differences between these two alloys being within the range of measurement errors. In other tested alloys, the weight losses after 16 h of wear were at a level of about 0.07 g. It should be noted that for all the three tested alloys, with exception of Wironit LA, the arrest on the abrasion curve was located at a level of the half total weight loss, i.e. for Remanium 2001 at approximately 0.015 g, and for other alloys at approximately 0.03 g.

Differences in hardness of the tested alloys, and also in the surface morphology and weight losses after abrasion can result from the possible occurrence of intermetallic phases [17] with hardness higher than the hardness of carbides formed in the interdendritic spaces [25]. The percent content of alloying elements included in the composition of the tested alloys determines the quantity and quality of the arising intermetallic phases and also of the carbides, which significantly affects the obtained results.

Conclusions

Given the interesting results obtained and the scarcity of literature data on the examined alloys as well as direct demand for them from the dental sector, it seems advisable to continue studies in this field.

In particular, it is necessary to determine what impact on the investigated alloys will have changes in the work environment, and in the size and type of friction elements. Moreover, it seems very important to define the specific impact of carbide precipitates on the process of abrasion.

Based on the studies conducted it was found that:

1. All alloys tested were characterised by the hardness of 403-439 HV10, which is the result by over 10% better than the values declared by the manufacturers of commercial alloys.

2. In all cases examined, the main mechanism operating during the abrasion test was microscratching. In the case of Remanium 2001, Wironit LA and Heraenium P alloys, some share in the wear process had also the abrasion mechanism in the form of microfurrowing.

3. Najmniejszą wartość ubytku masy notowano dla stopów Remanium 2001 oraz Wironit LA, przy czym charakter zmian dla obu stopów był różny. W przypadku stopu pierwszego krzywa ubytku masy w czasie posiadała wyraźne przystanki wynikające z mechanizmu ścierania oraz struktury materiału. W przypadku stopu Wironit LA notowano praktycznie liniową zależność zmiany masy w czasie.

4. Dla stopów Colado CC i Heraenium P obserwowane zmiany ubytku masy miały praktycznie taki sam charakter i zbliżone wartości. Otrzymane różnice pomiędzy oboma stopami wynosiły nie więcej niż 2%.

Podziękowania

Praca została wykonana w ramach badań statutowych prowadzonych na AGH Akademii Górniczo-Hutniczej, nr pracy 11.11.110.299.

3. The lowest weight loss was recorded for the Remanium 2001 and Wironit LA alloys, although the nature of changes was different in these two alloys. In the case of the former alloy, the curve of the weight loss had clear arrests related with the mechanism of abrasion and structure of the material. In the case of the Wironit LA alloy, an almost linear dependence of weight change over time was recorded.

4. For Colado CC and Heraenium P alloys, the observed changes in weight losses were practically of the same character and had the same values. The resulting differences between both alloys did not exceed 2%.

Acknowledgments

The work has been implemented within the framework of statutory research of AGH University of Science and Technology, contract No 11.11.110.299.

Piśmiennictwo

- [1] Loch J., Łukaszczyk A., Augustyn-Pięiążek J., Krawiec H.: Electrochemical behaviour of Co-Cr and Ni-Cr dental alloys. *Solid State Phenomena* (in press 2014).
- [2] Augustyn-Pięiążek J., Łukaszczyk A., Zapala R.: Microstructure and corrosion resistance characteristics of Co-Cr-Mo alloys designed for prosthetic materials. *Archives of Metallurgy and Materials* 58 (2013) 1281-1285.
- [3] Łukaszczyk A., Augustyn-Pięiążek J.: Corrosion resistance of Co-Cr-Mo alloy used in dentistry. *Archives of Metallurgy and Materials* (in press 2015).
- [4] Marciniak J., Kaczmarek M., Ziębowicz A.: *Biomaterials in Dentistry*, Publisher Silesian University of Technology, Gliwice 2008 (in Polish).
- [5] Surowska B.: Formation of chemical composition and structure of the alloy of Co-Cr-Ni-Mo as biomaterials. Publisher The University Lublin University of Technology, Lublin 1997 (in Polish).
- [6] Surowska B.: *Metallic biomaterials and the combination metal - ceramics in dental applications*. Publishing College, Lublin 2009 (in Polish).
- [7] Bojar Z.: Analysis of the impact of structure on resistance to corrosion and cracking alloys Co type of Vitallium, Publisher University of Technology, Warszawa 1992 (in Polish).
- [8] Craig R., Powers J.M., Wataha J.W.: *Dental Materials*, Polish edition, edited by H. Limanowska – Shaw, Medical Publisher Urban & Partner, Wrocław 2000 (in Polish).
- [9] Taylor R.N.J., Waterhouse R.B.: A study of the ageing behaviour of a cobalt based implant alloy. *Journal Materials Science* 18 (11) (1983) 3265-3280.
- [10] Clemow A.J.T., Daniell B.L.: Solution treatment behavior of Co-Cr-Mo alloy. *Journal of Biomedical Materials Research* 13(2) (1979) 265-279.
- [11] Walczak M., Pieniak D., Niewczas Agata M.: Effect of re casting on the useful properties CoCrMoW alloy. *Maintenance and Reliability* 16(2) (2014) 330-336.
- [12] Walczak M., Beer K., Surowska B., Borowicz J.: The issue of using remelted CoCrMo alloys in dental prosthetics. *Archives of Civil and Mechanical Engineering* 12(2) (2012) 171-177.

References

- [13] Kalandyk B., Głownia J.: Traveller Miller apparatus for determining the abrasion resistance of steel construction. *Archives of Foundry* 1(1) (2001) 520-525.
- [14] <http://www.dentaurum.de/eng/ccs-13232.aspx>
- [15] PN-EN ISO 10993-15 Biological evaluation of medical devices – Vol. 15; Identification and quantification of degradation products identified metals and alloys 2005 (in Polish).
- [16] Giachci J.V., Morando C.N., Fornaro O., Palacio H.A.: Microstructural characterization of as-cast biocompatible Co-Cr-Mo alloys, *Materials Characterization* 62 (2011) 53-61.
- [17] Podrez-Radziszewska M., Haimann K., Dudziński W., Morawska-Sołtysik M.: Characteristic of intermetallic phases in cast dental CoCrMo alloy. *Archives of Foundry Engineering* 10(3) (2010) 51-56.
- [18] Julián L.C., Muñoz A.I.: Influence of microstructure of HC CoCrMo biomedical alloys on the corrosion and wear behaviour in simulated body fluids. *Tribology International* 44 (2011) 318-329.
- [19] Montero-Ocampo C., Lopez H., Talavera M.: Effect of alloy pre-heating on the mechanical properties of as-cast Co-Cr-Mo-C alloys. *Metallurgical and Materials Transactions A* 30(3) (1999) 611-620.
- [20] Mikulewicz M., Szymkowski J., Stós W.: Analysis of microhardness orthodontic wires. *Dentist Medical Problem* 43(1) (2006) 79-83.
- [21] Kusy R.P.: Ongoing innovations in biomechanics and material for new millennium. *Angle Orthodontist* 70(5) (2000) 366-376.
- [22] Combe E.C.: *Introduction to dental materials science*, Warszawa 1997 (in Polish).
- [23] Błażewicz S., Stoch L.: *Biomaterials-Chemical engineering* (4), Academic Educational Oficyna Exit, Warszawa 2003 (in Polish).
- [24] Leda H.: *Engineering materials for biomedical applications*. Publisher University of Technology, Poznań 2011 (in Polish).
- [25] Augustyn-Pięiążek J., Kurtyka P., Sulima I., Stopka S.: Properties and tribological wear of materials used in dental prosthetics Co-Cr-Mo and Co-Cr-Mo-W alloys. *Archives of Metallurgy and Materials* (in press 2015).

BIODEGRADOWALNE POLIMERY FUNKCYJNE – ROZSZERZENIE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA BIOMATERIAŁÓW

MICHAŁ KAWALEC^{1*}, MAŁGORZATA PASTUSIAK¹,
JOANNA JAWORSKA¹, PATRYCJA KOMAR^{1,2},
PIOTR KURCOK^{1,2}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{1,2}

¹ CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE

² WYDZIAŁ MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZY,
AKADEMIA IM. JANA DŁUGOSZA W CZĘSTOCHOWIE,
AL. ARMII KRAJOWEJ 13/15, 42-200 CZĘSTOCHOWA

* E-MAIL: MICHAL.KAWALEC@CMPW-PAN.EDU.PL

Streszczenie

Acetyloacetoniany cyrkonu (IV), żelaza (III), cynku (II), lantanu (III), i itru (III) oraz tris(2,2,6,6-tetrametylo-3,5-heptanodionianu) skandu zostały z powodzeniem zastosowane w polimeryzacji modelowych 5-metylo-2-okso-1,3-dioksano-5-karboksyłanu etylu (MTC-Et) i 5-metylo-2-okso-1,3-dioksano-5-karboksyłanu benzylu (MTC-Bz) oraz α -bromo- ϵ -kaprolaktonu. Proces polimeryzacji prowadzono w masie w podwyższonej temperaturze. Zależność konwersji monomerów węglanowych od czasu polimeryzacji była monitorowana przy pomocy techniki ¹H NMR, a wysokocząsteczkowy produkt scharakteryzowano techniką SEC. Kinetyka prowadzonej reakcji zależała nie tylko od temperatury, ale również od rodzaju zastosowanego inicjatora. Zbadano również wpływ temperatury prowadzonej polimeryzacji na masy cząsteczkowe otrzymanych produktów. Badania te wykazały, że zależność temperatura polimeryzacji – masa molowa produktu jest skomplikowana i dla procesów istnieje temperatura optymalna. Co istotne, w szczególnych przypadkach otrzymywane poliwęglany charakteryzowały się frakcją o wysokiej masie przekraczającej nawet 1 Mg/mol. Szczegółowe wyniki przeprowadzonych badań ujawniły także relatywnie silną reakcję transestryfikacji towarzyszącą polimeryzacji z otwarciem pierścienia MTC-Et. W przypadku polimeryzacji MTC-Bz, którego podstawnik benzylowy powinien stanowić większą zawadę przestrzenną przy wiązaniu estrowym niż podstawnik etylowy MTC-Et i w ten sposób ograniczać transestryfikację, występowanie reakcji transacylowania wydaje się być jeszcze silniejsze. W przypadku α -bromo- ϵ -kaprolaktonu polimeryzacja z otwarciem pierścienia przebiegała najefektywniej, gdy była inicjowana acetyloacetonianem cyrkonu (IV) i tris(2,2,6,6-tetrametylo-3,5-heptanodionianem) skandu (III), pozwalając na otrzymanie polimeru funkcyjnego. Acetyloacetonian cynku (II) reagował z bromopochodną w sposób, który nie prowadził do otrzymania polimerów.

Słowa kluczowe: polimery bioresorbowalne, polimery funkcyjne, polimeryzacja koordynacyjna, cykliczne węglany, funkcjonalizowany kaprolakton, polimeryzacja z otwarciem pierścienia

[Inżynieria Biomateriałów 127 (2014) 16-21]

BIODEGRADABLE FUCTIONAL POLYMERS – EXTENDING FRONTIERS OF BIOMATERIALS

MICHAŁ KAWALEC¹, MAŁGORZATA PASTUSIAK¹,
JOANNA JAWORSKA¹, PATRYCJA KOMAR^{1,2},
PIOTR KURCOK^{1,2}, PIOTR DOBRZYŃSKI^{1,2}

¹ CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
4 M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE ST., 41-819 ZABRZE, POLAND

² FACULTY OF MATHEMATICS AND NATURAL SCIENCE,
JAN DŁUGOSZ UNIVERSITY IN CZESTOCHOWA,
13/15 ARMII KRAJOWEJ AVE., 42-200 CZESTOCHOWA, POLAND

* E-MAIL: MICHAL.KAWALEC@CMPW-PAN.EDU.PL

Abstract

A series of metal acetylacetonates (zirconium (IV), iron (III), zinc (II), lanthanum (III) and yttrium (III)) as well as scandium (III) tris(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate) were successfully applied in bulk polymerizations of model ethyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (MTC-Et) and benzyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (MTC-Bz) as well as α -bromo- ϵ -caprolactone. The polymerization experiments were carried out at elevated temperatures. Rate of the carbonate monomers conversion during polymerization experiments was followed by ¹H NMR while macromolecular product was also characterized with SEC technique. Rate of the monomers conversion was temperature-dependant but it relied also on type of applied polymerization initiator. The study revealed also strong dependence of the products molar masses on temperature regime. It was found that the reactions have some optimum temperature. Noticingly, several experimental conditions were found to yield polycarbonates containing fractions of high molar mass material of about 1 Mg/mol. Complementary results revealed occurrence of relatively strong transesterification in ring-opening polymerization of MTC-Et. Significantly bulkier benzyl substituent of MTC-Bz, in comparison with ethyl substituent of MTC-Et which was supposed to hinder sterically reactivity of the ester linkage, did not retard transesterification occurring during polymerization. Contrary, transacylation seemed to be even more pronounced in the case of MTC-Bz polymerization. In the case of α -bromo- ϵ -caprolactone ROP zirconium (IV) acetylacetonate and scandium(III) tris(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate) were found to be the most effective and allowed to obtain functional polymer. Zinc (II) acetylacetonate reacted with the brominated lactone without polymer formation.

Keywords: bioresorbable polymers, functional polymers, coordination polymerization, cyclic carbonate, functional caprolactone, ring-opening polymerization

[Engineering of Biomaterials 127 (2014) 16-21]

Wprowadzenie

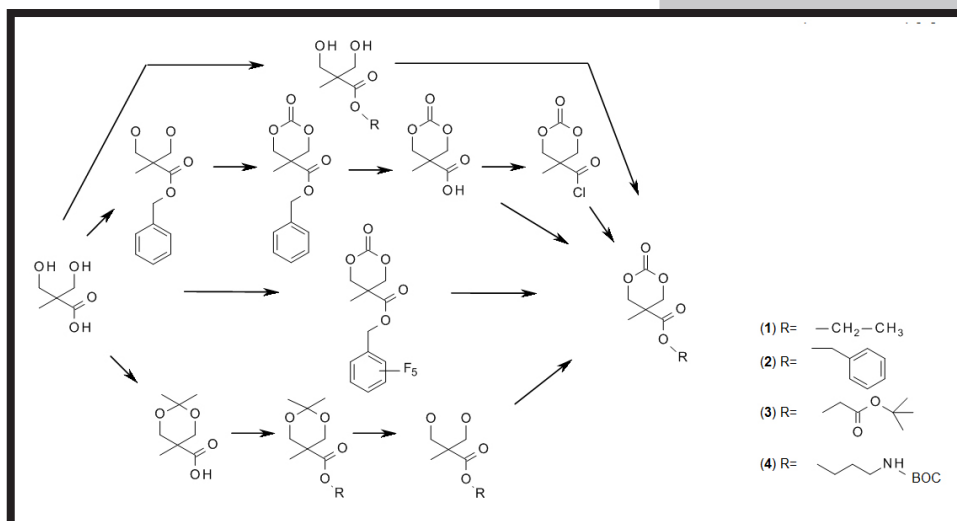
W ostatnich latach syntetyczne polimery funkcyjne stały się przedmiotem zainteresowań wielu badaczy jako potencjalne nowoczesne materiały pozwalające na modyfikację właściwości polimerów znanych od dawna. Niestety, większość komercyjnie dostępnych monomerów funkcyjnych to (met)akrylany, o których wiadomo, że tworzą polimery niedegradowalne. Odporność na biodegradację jednak nie zawsze jest pożądana, szczególnie w przypadku materiałów pełniących tymczasową rolę, jak ma to miejsce w wielu aplikacjach biomedycznych. Co więcej, jednymi z materiałów najczęściej badanymi pod względem aplikacji w zastosowaniach biomedycznych są alifatyczne poliestry otrzymywane z laktydów, glikolidu czy ϵ -kaprolaktonu. Polimery te zawdzięczają popularność właśnie biodegradowalności, biokompatybilności jak i dostępności komercyjnej monomerów, które w połączeniu z rozwojem technik polimeryzacji pozwalają na wytwarzanie materiałów o pożądanym właściwościach, jednak w ograniczonym zakresie. W ostatnim czasie zwrócono uwagę na alifatyczne poliwęglany, stosowane jako materiały do tymczasowego zastosowania, dzięki ich zdolności do biodegradacji oraz biokompatybilności [1]. W połączeniu z możliwością degradacji hydrolytycznej oraz niską toksycznością, poliwęglany są atrakcyjnymi materiałami nie tylko do zastosowań w branży rolniczej czy opakowaniowej, lecz są również jednymi z najczęściej stosowanych materiałów w obszarze biomedycznym czy farmacji jako: nośniki genów [2-4], systemy dostarczania leków oparte o nanocząstki [5], mikrosfery [6] czy hydrożele [7]. Na skutek relatywnie ograniczonego wyboru monomerów węglanowych dostępnych komercyjnie, zostało opracowane kilka dróg syntezy funkcyjnych cyklicznych węglanów. Obecnie doniesienia naukowe opisują ponad 80 różnych funkcyjnych cyklicznych węglanów posiadających różne grupy funkcyjne, zaprojektowane tak, aby poprawić właściwości materiałów polimerowych. Jednymi z najbardziej uniwersalnych prekursorów są: gliceryna, pentaerytryt czy kwas 2,2-bis(hydroksymetylo)propanowy (bis-MPA). Kilka strategii otrzymywania funkcyjnych cyklicznych węglanów z bis-MPA zostało przedstawione na SCHEMACIE 1 [8].

Dodatkowo literatura naukowa opisuje syntezę funkcyjnego zarówno ϵ -kaprolaktonu jak i poli(kaprolaktonu). Enolizacja poli(kaprolaktonu) z następczą reakcją wygenerowanego karboanionu z różnymi elektrofilami (benzaldehydem, chlorkiem naftoilu, chloromrówczanem benzylu i jodometanem) [9] prowadziła do stopnia podstawienia zależnego od warunków reakcji, jednak jednocześnie łańcuch główny PCL ulegał degradacji. Ta sama procedura została wykorzystana do syntezy α -jodo- ϵ -kaprolaktonu [10].

Introduction

Functional synthetic polymers have received considerable scientific interest and attention in recent years for their potential as promising novel materials enhancing properties of well-known polymers. However, the majority of commercially available functional monomers are (meth)acrylates which form respective polymers known to be non-degradable. Apparently, dormant character of the materials is not always desired, especially when temporary biomedical application is intended. In this field one of the most often investigated polymers are aliphatic polyesters comprising of lactides, glycolide and ϵ -caprolactone units. The polymers owe their popularity to the biodegradable and biocompatible character as well as commercial availability of the monomers which, in conjunction with developed polymerization techniques, gives access to materials of desired properties but until some extent. Recently, attention has been directed towards aliphatic polycarbonates for the manufacture of temporarily used materials thanks to their biodegradability and biocompatibility [1]. In combination with their ready hydrolysis and low toxicity, aliphatic polycarbonates are attractive materials not only in agricultural or packaging applications but they are one of the most often used synthetic materials in biomedical and pharmaceutical field as gene carriers [2-4], drug delivery systems based on either nanoparticles [5], microspheres [6] or hydrogels [7]. Although the choice of commercially available monomers is relatively limited, several routes have been developed to prepare functional cyclic carbonates. At the moment scientific literature describes more than 80 functional cyclic carbonates with different pendant functions designed to improve properties of polymeric materials. Of the most versatile precursors are glycerol, pentaerythritol and 2,2-bis(hydroxymethyl)propionic acid (bis-MPA). For instance, bis-MPA itself offers several synthetic strategies to obtain desired functional monomer (SCHEME 1) [8].

In fact, a few strategies are reported in literature describing synthesis of functional either ϵ -caprolactone or poly(caprolactone) (PCL). Enolization of poly(caprolactone) for subsequent reaction of such-formed carboanions with various electrophiles (benzaldehyde, and iodomethane) [9] led to the degree of substitution depending on experimental conditions while PCL itself, suffered main chain scission during the enolization. The same procedure was applied later on to produce α -iodo- ϵ -caprolactone [10].



SCHEMAT 1. Różnorodność syntezy cyklicznych węglanów i przykładowe grupy funkcyjne [8].

SCHEME 1. Versatility of functional cyclic carbonate synthesis and exemplary pendant groups [8].

Co istotne, została opracowana relatywnie prosta strategia otrzymywania α -chloro- ϵ -kaprolaktanu poprzez utlenianie dostępnego handlowo α -chlorocykloheksanonu kwasem *m*-chloronadtlenobenzoesowym. Duża wydajność reakcji utleniania i relatywnie prosta procedura syntezy monomeru zaowocowały syntezą kilku α -podstawionych- ϵ -kaprolaktanów, np. z grupami azydowymi [12], jak i funkcjonalizacją produktów polimeryzacji.

W niniejszym artykule opisano wyniki badań dotyczące homopolimeryzacji funkcjonalizowanych alifatycznych węglanów oraz α -podstawionego- ϵ -kaprolaktanu. Rozszerzeniem artykułu omawiającym wyniki kopolimeryzacji funkcjonalizowanych węglanów z węglanem 1,3-trimetylenowym i laktidem z użyciem koordynacyjnych inicjatorów polimeryzacji jest praca Pastusiak *et al.* „New functional aliphatic polycarbonates – materials for advanced biomedical applications” [13].

Materiały i metody

Monomery i inicjatory

5-Metylo-2-okso-1,3-dioxan-5-karboksylanu etylu (MTC-Et) i 5-metylo-2-okso-1,3-dioxan-5-karboksylanu benzylu (MTC-Bz) zostały otrzymane zgodnie z wcześniej opublikowaną procedurą [14]. α -Bromo- ϵ -kaprolaktan również został przygotowany wg wcześniejszej procedury [15]. Acetyloacetoniany cyrkonu (IV) ($Zr(acac)_4$) i żelaza (III) ($Fe(acac)_3$), jak i jednowodne acetyloacetoniany cynku (II) ($Zn(acac)_2 \times H_2O$), lantanu (III) ($La(acac)_3 \times H_2O$) i itru (III) ($Y(acac)_3 \times H_2O$) czy tris(2,2,6,6-tetrametyl-3,5-heptanodionian) skandu (III) ($Sc(TMHD) \times H_2O$) (wszystkie z Aldricha) były używane bez dodatkowego oczyszczania.

Polimeryzacja

Proces polimeryzacji prowadzono zgodnie z metodologią opisaną wcześniej [16]. Odpowiednie ilości wybranego monomeru i katalizatora wprowadzano do osuszonego reaktora zaopatrzonego w mieszadło magnetyczne, w atmosferze suchego argonu, który szczelnie zamykano. Następnie reaktor zanurzano w termostatowanej łaźni olejowej o pożądanej temperaturze (60°C, 80°C, 100°C, 120°C lub 150°C). Próbkę mieszaniny reakcyjnej pobierano w trakcie prowadzenia eksperymentów i badano konwersję monomerów. Scharakteryzowano również masę molową i dyspersję mas molowych końcowego produktu.

Techniki pomiarowe

Konwersja monomerów była określana techniką 1H NMR. Widma 1H NMR były rejestrowane przy 600 MHz używając spektrometru Avance II Bruker TM w 25°C. Suchy dimetylosulfotlenek- d_6 ($DMSO-d_6$) lub deuterowany chloroform były stosowane jako rozpuszczalniki, tetrametylosilan (TMS) był stosowany jako standard wewnętrzny. Widma 1H NMR były rejestrowane przy 64 skanach i czasie akwizycji 2,65 s oraz szerokości pulsu 11 μ s.

Liczbowo i wagowo średnie masy molowe (M_n i M_w , odpowiednio) oraz dyspersja mas molowych (\mathcal{D}) polimerów były charakteryzowane techniką SEC w tetrahydrofuranie, w temperaturze 35°C przy przepływie eluentu 1 mL/min, stosując układ dwóch wysokorozdzielczych kolumn PLgel 5 μ m MIXED-C. Stosowano pompę izokratyczną Spectra Physics 8800 różnicowy detektor refraktometryczny (VE3580, Viscotek) oraz detektor wiskozymetryczny (270 Dual Detector Array, tylko wiskozymetr, Viscotek). Analizowano 100 μ L 3% (w/v) roztworu próbki w eluencie. Standardy polistyrenowe o wąskim rozrzucie mas zastosowano do wygenerowania uniwersalnej krzywej kalibracji.

Noteworthy, relatively simple strategy of α -chloro- ϵ -caprolactone preparation was developed *via* one step oxidation of commercially available α -chloro-cyclohexanone with *m*-chloroperbenzoic acid [11]. Good yield of the oxidation and relative simplicity of the procedure came to fruition in synthesis of several α -substituted- ϵ -caprolactones e.g., with azide groups [12] as well as post-polymerization functionalization.

Herein, preliminary results of functional aliphatic carbonates and α -functionalized- ϵ -caprolactone homopolymerization mediated with coordination catalyst are presented. Discussion of the functional carbonates copolymerization with 1,3-trimethylene carbonate or lactide, initiated with the metal acetylacetonates can be found in the article Pastusiak *et al.* „New functional aliphatic polycarbonates – materials for advanced biomedical applications” [13].

Materials and Methods

Monomers and Initiators

Benzyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (MTC-Bz) and ethyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (MTC-Et) were synthesized according to the previously published procedure [14]. α -Bromo- ϵ -caprolactone was also prepared as described previously [15]. Zirconium (IV) ($Zr(acac)_4$) and iron (III) ($Fe(acac)_3$) acetylacetonates as well as zinc (II) ($Zn(acac)_2 \times H_2O$), lanthanum (III) ($La(acac)_3 \times H_2O$) and yttrium (III) ($Y(acac)_3 \times H_2O$) acetylacetonate hydrates as well as scandium(III) tris(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate) ($Sc(TMHD) \times H_2O$) (all from Aldrich) were used as initiators without further purification.

Polymerization

Polymerization experiments were carried out as described previously [16]. Briefly: desired amounts of selected monomers and catalyst were charged into flame-dried flask equipped with magnetic stirring bar under dry argon flow and sealed. Next, the flask was immersed in oil bath of desired temperature (60°C, 80°C, 100°C, 120°C or 150°C). Aliquots were withdrawn during the process and monomer conversion was determined. Additionally, molar mass and molar mass distribution of final products were characterized.

Measurements

The conversion of the monomers was determined by 1H NMR spectroscopy. The 1H NMR spectra were recorded at 600 MHz using an Avance II Bruker TM at 25°C. Dried dimethyl sulfoxide- d_6 ($DMSO-d_6$) or deuterated chloroform were used as the solvent, and tetramethylsilane (TMS) was applied as the internal standard. The 1H NMR spectra were obtained with 64 scans, 2.65 s acquisition time, and 11 μ s pulse width.

Number-, weight-average molar mass (M_n and M_w , respectively) and molar mass distribution (\mathcal{D}) values of polymers were determined by SEC experiments conducted in THF at 35°C with eluent flow rate of 1 mL/min., using a set of two PLgel 5 μ m MIXED-C ultrahigh efficiency columns. Isocratic pump Spectra Physics 8800 as a solvent delivery system, differential refractive index detector (VE3580, Viscotek), viscometer detector (270 Dual Detector Array, viscometer only, Viscotek) were applied. A volume of 100 μ L of 3% (w/v) sample solution in eluent was analyzed. Narrow polystyrene standards were used to generate a universal calibration curve according to which samples were calculated.

Wyniki i dyskusja

Polimeryzacja z otwarciem pierścienia modelowego 5-metylo-2-okso-1,3-dioxan-5-karboxylanu etylu (MTC-Et, SCHEMAT 1. R(1)) była prowadzona przy stosunku inicjator/monomer 1/1000. Hydraty acetyloacetoniów cynku (II) ($Zn(acac)_2 \times H_2O$), lantanu (III) ($La(acac)_3 \times H_2O$) oraz itru (III) ($Y(acac)_3 \times H_2O$) jak i hydrat tris(2,2,6,6-tetrametyl-3,5-heptanodionianu) skandu (III) ($Sc(TMHD) \times H_2O$) stosowano jako inicjatory polimeryzacji. Wyniki eksperymentów zebrano w TABELI 1.

Dane zebrane w TABELI 1 obrazują silną zależność kinetyki konwersji monomeru od temperatury. W wszystkich przypadkach badany produkt otrzymano dla konwersji monomeru większej niż 90%. Najefektywniejszym katalizatorem otwarcia monomeru, w badanym procesie, okazał się $Zn(acac)_2 \times H_2O$, jednak otrzymany materiał charakteryzował się relatywnie małą masą molową. Tylko produkt otrzymany w temperaturze 150°C (TABELA 1, Lp. 3) był jedynym o M_n powyżej 10000 i imponującym M_w ponad 330000. Należy podkreślić, że w tym przypadku w otrzymanym materiale znajdowała się również znacząca część makromolekuł o masach powyżej 1000000 g/mol ($M_z = 1950000$ g/mol). Polimeryzacje katalizowane acetyloacetoniem lantanu i prowadzone w 80°C ujawniły lepszą kontrolę nad dyspersyjnością mas molowych, podczas gdy w eksperymencie prowadzonym w 150°C otrzymano materiał o dużej dyspersyjności mas molowych, ale i o znacznie większej wagowo średniej masie molowej. Polimeryzacja katalizowana acetyloacetoniem itru przebiegała w relatywnie kontrolowany sposób, niezależnie od temperatury polimeryzacji. Biorąc pod uwagę fakt, iż poliwęglany są stosunkowo odporne na dorogorzędowe reakcje transacylowania oraz fakt otrzymywania produktów o tak dużych dyspersyjnościach mas molowych, sugeruje to zachodzenie reakcji transestryfikacji. MTC-Et jednak, prócz grupy węglanowej posiada również grupę estrową, która może ulegać procesom transacylowania, w wyniku których powinny powstawać struktury rozgałęzione, prowadzące do frakcji produktu o wysokich masach molowych.

Results and Discussions

Ring-opening polymerization of model ethyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate (MTC-Et; SCHEME 1. R(1)) was carried out in bulk at monomer/initiator ratio 1/1000. Acetylacetonates hydrates of zinc (II) ($Zn(acac)_2 \times H_2O$), lanthanum (III) ($La(acac)_3 \times H_2O$) and yttrium (III) ($Y(acac)_3 \times H_2O$) were applied as initiators. The results are summarized in TABLE 1.

Data gathered in TABLE 1 depict strong temperature dependence of monomer conversion rate. In all cases investigated products were obtained at monomer conversion higher than 90%. Apparently, $Zn(acac)_2 \times H_2O$ appeared to be the most effective initiator in the studied process however, resulting materials revealed relatively low molar masses. In fact, product of polymerization carried out at 150°C (TABLE 1, Entry 3) was the only one with M_n above 10000 and impressive M_w above 330000. It should be pointed out that this material consisted also of high-molar-mass fraction exceeding mass of 1000000 g/mol ($M_z = 1950000$ g/mol). Polymerizations mediated with lanthanum acetylacetonate and carried out at 80°C revealed much better control over molar mass dispersity while experiment carried out at 150°C resulted in highly disperse material with far higher weight-average molar mass. Yttrium acetylacetonate was mediating polymerization in relatively controlled manner regardless of the temperature. In fact, carbonates are known to be relatively dormant towards secondary transacylation reaction therefore the phenomenon of obtaining materials with such a high molar mass dispersity is explained indeed by transesterification process. Apparently, MTC-Et possesses also ester group available for the transesterification which should lead to branched structures and high-molar-mass material fractions.

TABELA 1. Wyniki polimeryzacji z otwarciem pierścienia MTC-Et prowadzonej w masie.
TABLE 1. Results of MTC-Et ring-opening polymerization carried out in bulk.

Lp. Entry	Inicjator Initiator	Temperatura Temperature [°C]	Czas Time [h]	Konwersja Conversion [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}
1	$Zn(acac)_2 \times H_2O$	80	7.5	91	5000	8000	1.70
2		100	4.0	96	7000	18000	2.51
3		150	1.5	90	14000	333000	23.76
4	$La(acac)_3 \times H_2O$	80	48.0	97	13000	23000	1.79
5		150	3.0	92	15000	349000	23.54
6	$Y(acac)_3 \times H_2O$	80	48.0	97	9000	22000	2.40
7		150	2.7	92	16000	88000	5.50

TABELA 2. Wyniki polimeryzacji z otwarciem pierścienia MTC-Bz prowadzonej w masie.
TABLE 2. Results of MTC-Bz ring-opening polymerization carried out in bulk.

Lp. Entry	Inicjator Initiator	Temperatura Temperature [°C]	Czas Time [h]	Konwersja Conversion [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}
1	$Zn(acac)_2 \times H_2O$	80	24	95	15000	24000	1.60
2 ^{a)}		100	24	94	4400	6500	1.45
3		150	5	90	12000	28000	2.27
4	$La(acac)_3 \times H_2O$	80	28	95	5000	49000	9.41
5 ^{b)}		150	7	92	5000	21500	4.13
6	$Y(acac)_3 \times H_2O$	80	28	96	5000	267000	54.07
7		150	7	92	6000	87000	15.00

^{a)} $M_n = 4500$ i $M_w = 6000$ dla stopnia konwersji = 70% (6h); ^{b)} $M_n = 25000$ i $M_w = 55000$ dla stopnia konwersji = 70% (10 min)

^{a)} $M_n = 4500$ and $M_w = 6000$ at degree of conversion = 70% (6h); ^{b)} $M_n = 25000$ and $M_w = 55000$ at degree of conversion = 70% (10 min)

W celu zredukowania wpływu procesu transestryfikacji podczas polimeryzacji węglanów MTC-X, został przygotowany MTC-Bz (5-metylo-2-okso-1,3-dioksan-5-karboksylan benzylu, SCHEMAT 1. R(2)), posiadający znacznie większy podstawnik w sąsiedztwie wiązania estrowego, a jego homopolimeryzacja była badana w tych samych warunkach co MTC-Et (wyniki zebrane w TABELI 2).

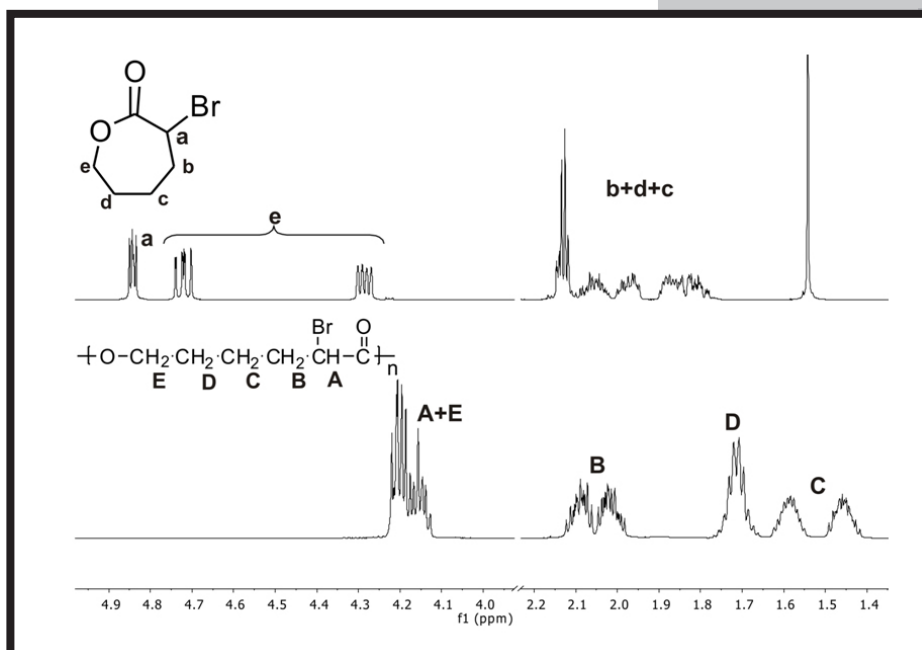
W przypadku polimeryzacji monomeru MTC-Bz również $Zn(acac)_2 \times H_2O$ był najaktywniejszym inicjatorem, jednak otrzymane materiały charakteryzowały się małymi masami molowymi. Ponadto materiał otrzymany w $100^\circ C$ posiadał najgorsze parametry pod względem masy molowej, podczas gdy produkty otrzymane w $80^\circ C$ i $150^\circ C$ charakteryzowały się większymi masami molowymi. Polimeryzacje inicjowane acetyloacetonianami lantanu lub itru przebiegały z podobną kinetyką otwarcia pierścienia monomeru, a otrzymywane materiały posiadały M_n około 5000 g/mol , chociaż w przypadku reakcji inicjowanej $Y(acac)_3 \times H_2O$ M_w produktu osiągnęło aż 87000 g/mol i 267000 g/mol dla procesów prowadzonych w $150^\circ C$ i $80^\circ C$, odpowiednio. Porównując polimeryzacje MTC-Et i MTC-Bz zaobserwowano, że monomer z mniejszą zawadą przestrzenną (MTC-Et) ulegał reakcjom transestryfikacji w mniejszym stopniu.

Polimeryzacja z otwarciem pierścienia α -bromo- ϵ -kapolaktonu (BrCL) była prowadzona w masie w $60^\circ C$ i stosunku inicjator/monomer 1/500 stosując acetyloacetoniany cyrkonu (IV), lantanu (III), itru (III) i żelaza (III), jak również tris(2,2,6,6-tetrametyl-3,5-heptanodionian) skandu (III) jako inicjatory polimeryzacji. Okazało się, że $Zr(acac)_4$ był najbardziej aktywnym spośród badanych inicjatorów. Konwersja monomeru osiągnęła 49% po 96 h prowadzenia eksperymentu, a masa molowa produktu osiągnęła $M_n = 13500 \text{ g/mol}$ i $\bar{D} = 2,18$. Drugim pod względem aktywności okazał się $Sc(TMHD) \times H_2O$, gdzie konwersja monomeru osiągnęła 46% po 120 h, podczas gdy w innych przypadkach konwersja monomeru wahała się pomiędzy 23% i 32% po 120 h. Ponadto polimeryzacja BrCL inicjowana $Zr(acac)_4$ i prowadzona w $120^\circ C$ wykazała prawie ilościową (99%) konwersję monomeru po zaledwie 24 h (RYS. 1) jak również $M_n = 13000 \text{ g/mol}$ i $\bar{D} = 2,48$ produktu. Brak wzrostu masy molowej pomimo dużego stopnia konwersji monomeru i wzrost dyspersji mas molowych sugerują istnienie relatywnie silnej transestryfikacji w tym przypadku. Co istotne, hydrat acetyloacetonianu cynku (II) był zbyt reaktywny, a próby polimeryzacji prowadziły do reakcji z monomerem w sposób niezdefiniowany i bez pożądanego produktu.

In order to reduce influence of transesterification process during polymerization of MTC-X monomers, MTC-Bz (benzyl 5-methyl-2-oxo-1,3-dioxane-5-carboxylate; SCHEME 1, R(2)), possessing far bulkier substituent in vicinity of ester linkage, was prepared and its polymerization was investigated in the same experiments (results collected in TABLE 2).

In fact, in the case of MTC-Bz monomer also $Zn(acac)_2 \times H_2O$ seemed to be the most active initiator however, obtained material revealed low molar masses. Moreover, polymerization carried out at $100^\circ C$ revealed the worst molecular parameters of the product while polymers obtained at $80^\circ C$ and $150^\circ C$ possessed much higher molar masses. Lanthanum and yttrium acetylacetonates mediated polymerizations with similar monomer conversion rate yielding material of number-average molar masses around 5000 g/mol although in the case of $Y(acac)_3 \times H_2O$ M_w s of the materials reached 87000 g/mol and 267000 g/mol for processes carried out at $150^\circ C$ and $80^\circ C$, respectively. Comparing polymerizations of MTC-Et and MTC-Bz it was noticed that monomer with smaller steric hindrance (MTC-Et) revealed lower transesterification phenomenon.

Ring-opening polymerization of α -bromo- ϵ -caprolactone (BrCL) was carried out in bulk at $60^\circ C$ and monomer/initiator ratio 1/500 applying acetylacetonates of zirconium (IV), lanthanum (III), yttrium (III) and iron (III) as well as scandium(III) tris(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate) as initiators. Apparently, $Zr(acac)_4$ appeared to be the most active catalyst of this process among all screened compounds. Monomer conversion reached 49% after 96 h of carrying out the experiment and molar mass of the product was $M_n = 13500 \text{ g/mol}$ and $\bar{D} = 2,18$. In the case of the second most active ($Sc(TMHD) \times H_2O$) monomer conversion reached 46% after 120 h while in other cases conversion varied between 23% and 32% after 120 h. Moreover, polymerization of BrCL initiated with $Zr(acac)_4$ and carried out at $120^\circ C$ revealed almost quantitative (99%) monomer conversion after only 24 h (FIG. 1) but its $M_n = 13000 \text{ g/mol}$ and $\bar{D} = 2,48$. Lack of molar mass increase despite high degree of the monomer conversion and molar mass dispersity increase suggests occurrence of relatively strong transesterification reactions. Noteworthy, zinc (II) acetylacetonate hydrate was too reactive and reacted with the monomer in indefinite manner not yielding macromolecules.



RYS. 1. Widmo 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) α -bromo- ϵ -kapolaktonu (góra) oraz poli(α -bromocaprolaktonu) otrzymanego w polimeryzacji inicjowanej $Zr(acac)_4$ i prowadzonej w $120^\circ C$ przez 24 h (dół). FIG. 1. 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) spectrum of α -bromo- ϵ -caprolactone (top) and poly(α -bromocaprolactone) obtained in $Zr(acac)_4$ mediated bulk polymerization carried out at $120^\circ C$ for 24 h (bottom).

Wnioski

Hydraty acetyloacetonianów cynku (II), lantanu (III) i itru (III) okazały się efektywnymi inicjatorami polimeryzacji z otwarciem pierścienia modelowych funkcjonalizowanych cyklicznych węglanów, prowadzonej w masie. Liczbowo średnie masy molowe otrzymanych węglanów były relatywnie małe, lecz jednocześnie otrzymywano materiały posiadające frakcję o masie molowej przekraczającej 1×10^6 g/mol, co nie jest zwykle obserwowane w polimeryzacji cyklicznych węglanów. Szerokie rozrzuty mas molowych polimerów były obserwowane w większości otrzymanych produktów, co najprawdopodobniej świadczy o transestryfikacji pobocznych grup estrowych. Co więcej, większy podstawnik (benzyl) w sąsiedztwie wiązania estrowego nie wpłynął na retardację transestryfikacji. Zaobserwowano również, że nawet w przypadku jednego inicjatora relacja temperatura procesu – masa molowa produktu jest złożonym zagadnieniem (TABELA 2, Lp. 1-3). Ponadto, acetyloacetonian cyrkonu (IV) i tris(2,2,6,6-tetrametyl-3,5-heptanodionian) skandu (III) były efektywnymi katalizatorami polimeryzacji α -bromo- ϵ -kapolaktanu. W kolejnych krokach planuje się otrzymanie poliwęglanów z podstawnikami bromoalkanowymi, podczas gdy pierwsze eksperymenty uwodorniania P(MTC-Bz) do polikwasów jak i alkilowania aminy P(BrCL) są bardzo obiecujące.

Podziękowania

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt nr UMO-2012/07/B/ST5/00616 „Nowe funkcjonalizowane kopolimery węglanowe. Badania otrzymywania nowoczesnych, funkcyjnych i biogodnych materiałów metodą polimeryzacji z otwarciem pierścienia katalizowanej koordynacyjnie” oraz Fundację na rzecz Nauki Polskiej: Homing Plus 2013/7/7, projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach PO IG.

Conclusions

Acetylacetonate hydrates of zinc (II), lanthanum (III) and yttrium (III) were found to be efficient initiators of ring-opening polymerization of model functional cyclic carbonates carried out in bulk. Number-average molar masses of the obtained polycarbonates were relatively low but high-molar-mass fractions exceeded even 1000000 g/mol which is unusual in the case of aliphatic carbonates ROP. Relatively broad molar mass distributions of the polymers were observed in majority of products the most probably as a consequence of the carbonate pendant ester group transesterification. Noteworthy, bulkier substituent (benzyl) in vicinity of the ester group did not retard this secondary reaction. It was also noticed that even in the case of one initiator relationship temperature-molar mass of products is relatively complex phenomenon (TABLE 2, Entries 1-3). Moreover, zirconium (IV) acetylacetonate and scandium(III) tris(2,2,6,6-tetramethyl-3,5-heptanedionate) were found to be effective catalyst of α -bromo- ϵ -caprolactone polymerization. In next steps there will be obtained poly(carbonate)s with pendant bromoalkane substituents while preliminary experiments of P(MTC-Bz) hydrogenation to polyacid as well as amine alkylation of P(BrCL) are very promising.

Acknowledgments

A financial support has been provided by National Science Centre Poland, project No. UMO-2012/07/B/ST5/00616 “Novel copolymers of functionalized cyclic carbonates. Investigation of synthesis of novel, functional and biocompatible materials by coordination ring-opening polymerization” and Foundation for Polish Science: Homing Plus 2013/7/7 co-financed by the European Union within the Innovative Economy Programme.

Piśmiennictwo

- [1] Welle A., Kroger M., Doring M., Niederer K., Pindel E., Chronakis S.: Electrospun aliphatic polycarbonates as tailored tissue scaffold materials. *Biomaterials* 28 (2007) 2211-2219.
- [2] Seow W.Y., Yang Y.Y.: Functional polycarbonates and their self-assemblies as promising non-viral vectors. *Original. J. Controlled Release* 139 (2009) 40-47.
- [3] Cooley C.B., Trantow B.M., Nederberg F., Kiesewetter M.K., Hedrick J.L., Waymouth R. M., Wender P.A.: Oligocarbonate Molecular Transporters: Oligomerization-Based Syntheses and Cell-Penetrating Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 16401-16403.
- [4] Yang C., Ong Z.Y., Yang Y.-Y., Ee P.L.R., Hedrick J.L.: Novel Biodegradable Block Copolymers of Poly(ethylene glycol) (PEG) and Cationic Polycarbonate: Effects of PEG Configuration on Gene. *Macromol. Rapid Commun.* 32 (2011) 1826-1833.
- [5] Le Hellaye M., Fortin N., Guilloteau J., Soum A., Lecommandoux S., Guillaume S. M.: Biodegradable Polycarbonate-*b*-polypeptide and Polyester-*b*-polypeptide Block Copolymers: Synthesis and Nanoparticle Formation Towards Biomaterials. *Biomacromolecules* 9 (2008) 1924-1933.
- [6] Hu B., Tu Y.-Y., Yan G.-P., Zhuo R.-X., Bottle S. E., Wu Y., Fan C.-L., Duan Y.-J.: Polycarbonate microspheres containing mitomycin C and magnetic powders as potential hepatic carcinoma therapeutics. *Colloids Surf. B* 84 (2011) 550-555.
- [7] Sahoo S., Kumar N., Bhattacharya C., Sagiri S.S., Jain K., Pal K., Ray S.S., Nayak B.: Organogels: Properties and Applications in Drug Delivery. *Des. Monomers Polym.* 14 (2011) 95-108.
- [8] Tempelaar S., Mespouille L., Coulembier O., Dubois P., Dove A.P.: Synthesis and post-polymerisation modifications of aliphatic poly(carbonate)s prepared by ring-opening polymerization. *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 1312-1336.

References

- [9] Ponsart S., Coudane J., Vert M.: A Novel Route To Poly(ϵ -caprolactone)-Based Copolymers via Anionic Derivatization. *Biomacromolecules* 1 (2000) 275-281.
- [10] El Habnoui S., Darcos V., Coudane J.: Synthesis and Ring Opening Polymerization of a New Functional Lactone, α -Iodo- ϵ -caprolactone: A Novel Route to Functionalized Aliphatic Polyesters. *Macromol. Rapid Commun.* 30 (2009) 165-169.
- [11] Lou X., Detrembleur C., Lecomte P., Jerome R.: Controlled synthesis and chemical modification of unsaturated aliphatic (Co) polyesters based on 6,7-dihydro-2(3H)-oxepinone. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 40 (2002) 2286-2297.
- [12] Riva R., Schmeits S., Stoffelbach F., Jerome C., Jerome R., Lecomte P.: Combination of ring-opening polymerization and “click” chemistry towards functionalization of aliphatic polyesters. *Chem. Commun.* 2005, 5334-5336.
- [13] Pastusiak M., Kawalec M., Jaworska J., Kurcok P., Janeczek H., Dobrzynski P.: New functional aliphatic polycarbonates – materials for advanced biomedical applications. *Eng. Biomat.* 17 (2014) 103-106.
- [14] Kawalec M., Dove A. P., Mespouille L., Dubois P.: Morpholine-functionalized polycarbonate hydrogels for heavy metal ion sequestration. *Polym. Chem.* 4 (2013) 1260-1270.
- [15] Wanga G., Shia Y., Fua Z., Yanga W., Huang Q., Zhang Y.: Controlled synthesis of poly(ϵ -caprolactone)-graft-polystyrene by atom transfer radical polymerization with poly(ϵ -caprolactone-co- α -bromo- ϵ -caprolactone) copolymer as macroinitiator. *Polymer* 46 (2005) 10601-10606.
- [16] Dobrzynski P., Pastusiak M., Bero M.: Less Toxic Acetylacetonates as Initiators of Trimethylene Carbonate and 2,2-Dimethylene Carbonate Ring Opening Polymerization. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 43 (2005) 1913-1922.

NANOKOMPOZYT POLY(ϵ -KAPROLAKTON)/TLENKI ŻELAZA DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

MAŁGORZATA ŚWIĘTEK^{1*}, JUSTYNA GWIZDAŁA¹,
WALDEMAR TOKARZ², ELŻBIETA MENASZEK³, MARTA BŁAŻEWICZ¹

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

² AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ FIZYKI
I INFORMATYKI STOSOWANEJ, KATEDRA FIZYKI CIAŁA STAŁEGO,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

³ UNIwersytet Jagielloński, Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum, Zakład Cyto biologii,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW

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

Streszczenie

Nanokompozyty polimerowe stanowią szeroką grupę materiałów znajdujących zastosowanie zarówno w wielu gałęziach przemysłu, jak i w medycynie. Fenomen nanokompozytów związany jest z łatwością modyfikacji ich cech materiałowych będących pochodną właściwości zarówno samego polimeru, jak i zastosowanego nanododatku. Pozwala to na projektowanie oraz wytwarzanie materiałów o określonej charakterystyce, adresowanych do konkretnych potrzeb.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie oraz charakterystyka polimerowych nanokompozytów o właściwościach magnetycznych. Jako osnowę polimerową wykorzystano biogodny i bioresorbowalny poli(ϵ -kaprolakton), do którego wprowadzono cząstki magnetytu znajdujące się w dyspersji nanometrycznej. Do przygotowania materiałów zastosowano prostą metodę odlewania filmu/odparowania rozpuszczalnika. W celu zbadania wpływu zawartości nanododatku na właściwości nanokompozytu przygotowano serię materiałów różniących się od siebie ilością wprowadzonych do matrycy polimerowej cząstek magnetycznych (0; 0,5; 1 oraz 2%). Charakterystyka nanokompozytów obejmowała badania własności magnetycznych i powierzchniowych materiałów oraz ocenę ich degradacji oraz biogodności. Pętle histerezy wprowadzonego do matrycy polimerowej nanododatku oraz otrzymanych nanokompozytów wykazywały przebieg typowy dla multidomenowych materiałów ferrimagnetycznych. Zaobserwowano, że istnieje korelacja pomiędzy wartością namagnesowania nasycenia oraz remanencją, a zawartością cząstek magnetycznych w nanokompozycie. Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że część wprowadzonych cząstek magnetycznych ulega aglomeracji, reszta zaś pozostaje w dyspersji nanometrycznej. Wytworzone materiały nie wykazały toksycznego wpływu na komórki (Normal Human Osteoblast), co pozwala sądzić, że otrzymane nanokompozyty mogłyby zostać wykorzystane w medycynie.

Słowa kluczowe: magnetyczne nanokompozyty, polimery, magnetyt, cząstki magnetyczne

[Inżynieria Biomateriałów 127 (2014) 22-32]

POLY(ϵ -CAPROLACTONE)/IRON OXIDES NANOCOMPOSITE FOR MEDICAL APPLICATIONS

MAŁGORZATA ŚWIĘTEK^{1*}, JUSTYNA GWIZDAŁA¹,
WALDEMAR TOKARZ², ELŻBIETA MENASZEK³, MARTA BŁAŻEWICZ¹

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

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF PHYSICS AND APPLIED COMPUTER SCIENCE,
DEPARTMENT OF SOLID STATE PHYSICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

³ JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKOW, POLAND

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

Abstract

Polymer nanocomposites are a wide group of materials which have applications in many branches of industry as well as in medicine. The phenomenon of nanocomposites is associated with simplicity of modification of their features, which are derived from properties of both the polymer matrix and the nanoadditive. This property enables to design and fabricate materials with strictly defined characteristics, addressed to specific needs.

The aim of the presented studies was fabrication and characterization of polymer nanocomposites with magnetic properties. As a polymer matrix, a biocompatible and bioresorbable poly(ϵ -caprolactone) was used. Magnetite powder with nanometer-sized grain fraction was introduced into the polymer matrix as a magnetic nanoadditive. As a fabrication method casting film/solvent evaporation was applied. In order to examine how amount of magnetic nanoadditive influences the properties of nanocomposites, the series of materials with various concentrations of magnetic particles was prepared (0, 0.5, 1 and 2%). Characterization of materials included magnetic and surface properties investigations as well as evaluation of degradability, and biocompatibility of the fabricated materials. Magnetic hysteresis loops of both the nanoadditive itself and the nanocomposite demonstrate curves typical for multi-domain ferrimagnetic materials. Existence of the correlation between the values of magnetic saturation and remanence, and the content of magnetic particles has been observed. Microscopic evaluations have shown that small part of magnetic particles has tendency to agglomerate but the rest remains in nanometric dispersion. For the fabricated materials no cytotoxic influence on the cells was observed (Normal Human Osteoblast). This suggests that obtained nanocomposites could find application in medicine.

Keywords: magnetic nanocomposites, polymer, magnetite, magnetic particles

[Engineering of Biomaterials 127 (2014) 22-32]

Szybki rozwój nanotechnologii, obserwowany na przestrzeni kilku ostatnich dekad sprawił, że nanomateriały stały się nieodłączoną częścią życia współczesnego człowieka. Zdobyte nanotechnologii wykorzystywane są m.in. w przemyśle motoryzacyjnym, energetycznym, żywnościowym, a także do produkcji nowoczesnych urządzeń elektronicznych zwiększając ich wydajność oraz w znacznym stopniu obniżając koszty produkcji [1-2]. Zgodnie z definicją o obiekcie w skali nano możemy mówić gdy przynajmniej jeden z jego wymiarów mieści się w zakresie pomiędzy 1-100 nm. Niewielkie rozmiary oraz wysoki stosunek powierzchni do objętości w przypadku nanomateriałów powodują, że posiadają one unikatowe właściwości, a także podlegają charakterystycznym dla nich tylko zjawiskom, niewystępującym w przypadku ich odpowiedników w skali mikro- i makroskopowej [3]. Ponadto, pod względem wielkości nanocząstki zbliżone są do makromolekuł biologicznych tj. białek, genów i znacząco mniejsze od komórek [4]. Z wyżej wymienionych względów nanomateriały cieszą się nielubianym zainteresowaniem w kontekście ich zastosowania w medycynie, a liczba potencjalnych aplikacji i rozwiązań z roku na rok wzrasta. Szczególnym przypadkiem nanocząstek wykorzystywanych w medycynie są nanocząstki o właściwościach magnetycznych. Znajdują one zastosowanie m.in. w znakowaniu [5-6] i separacji komórek [7-8], leczeniu chorób nowotworowych metodą hipertermii magnetycznej [9-10], jako środki kontrastujące w rezonansie magnetycznym [11] oraz do kontrolowanego dostarczania leków [11-12]. W systemach DDS (Drug Delivery Systems) nanocząstki magnetyczne mogą stanowić zarówno nośniki substancji farmakologicznej, jak i czynniki wspomagające ich efektywne wychwytywanie w miejscach docelowego działania (tzw. Implant Assisted Magnetic Drug Targeting) [13].

W literaturze pojawia się coraz więcej prac dotyczących zastosowania nanocząstek o właściwościach magnetycznych w medycynie regeneracyjnej tkanki kostnej [14-17]. Zgodnie z definicją podaną przez Daar A.S. i Greenwood H. medycyna regeneracyjna stanowi interdyscyplinarny obszar badań i aplikacji klinicznych mających na celu naprawę, zastąpienie oraz regenerację komórek, tkanek i organów w celu przywrócenia ich funkcji upośledzonych, bądź też utraconych w wyniku wad wrodzonych, chorób, schorzeń czy zachodzącego procesu starzenia [18]. Medycyna regeneracyjna łączy w sobie osiągnięcia takich dyscyplin nauki jak inżynieria tkankowa, biologia, genetyka, transplantologia oraz inżynieria materiałowa. Kluczowym elementem zapewniającym prawidłową odbudowę tkanki jest rusztowanie spełniające szereg warunków związanych m.in. z odpowiednim doбором parametrów mechanicznych, kontrolą czasu biodegradacji, a także biomimetyzmem strukturalnym [19-22]. Czynniki te są szczególnie istotne w odniesieniu do regeneracji tkanki kostnej w przypadku, której jedynie proces odbudowy przebiegający w optymalnie dobranych warunkach umożliwi odbudowę kości zdolnej do całkowitego przejścia swych naturalnych funkcji po biodegradacji podłoża. Odbudowa tkanki kostnej może być wspomagana nie tylko poprzez zastosowanie odpowiednio dobranych materiałów, lecz także w wyniku oddziaływania z zewnętrznym, statycznym polem magnetycznym [26-27]. Z tego względu modyfikacja cząstkami magnetycznymi bioresorbowalnej matrycy polimerowej wydaje się być obiecującym krokiem naprzód w celu wytworzenia wielofunkcyjnego, biomimetycznego podłoża do regeneracji tkanki kostnej, którego właściwości i oddziaływanie z otaczającą go tkanką mogłyby być regulowane poprzez zewnętrzne, ściśle kontrolowane pole magnetyczne.

Fast development of nanotechnology, observed over the last decades, has made nanomaterials inseparable part of modern man's life. Achievements in nanotechnology are used e.g. in automotive, energetic and food industries as well as in production of novel electronic devices, increasing their efficiency and decreasing costs of their production [1-2]. According to the definition, nanoobject possesses at least one dimension in a range between 1-100 nm. Small sizes and high surface/volume ratio yield properties of nanomaterials which are unique and unachievable for their equivalents in micro and macro scale [3]. Furthermore, in respect of their size, nanoparticles are similar to building blocks of biological macromolecules, such as proteins and genes which are significantly smaller than cells [4]. For the above-mentioned reasons, nanomaterials are a subject of an unabated interest in context of their potential application in medicine. This trend finds reflection in constantly growing number of scientific reports, published each year, concerning various aspects of nanomedicine. Among those, special attention should be drawn to nanoparticles with magnetic properties that find numerous potential applications e.g. in cell labeling [5-6] and separation [7-8], magnetic hyperthermia in cancer treatment [9-10], as contrast agents for an MRI [11] or as a drug delivery system [11-12]. In the case of the latter, nanoparticles can serve either as drug carriers or as a component, supporting capture of biologically active substances in targeted place of action (so-called Implant Assisted Magnetic Drug Targeting) [13].

In the literature an increasing number of scientific papers concerning applications of magnetic nanoparticles in bone regenerative medicine is being published [14-17]. According to the definition of Daar A.S. and Greenwood H., regenerative medicine is an interdisciplinary area of research and clinical application, designed to repair, replace or regenerate cells, tissues and organs, in order to restore their functions, which were impaired or lost by birth defects, illnesses, diseases or as an effect of progressive ageing [18]. Regenerative medicine combines achievements of various branches of science, such as tissue engineering, biology, genetics, transplantology or materials engineering. Crucial element, providing correct tissue reconstruction, is a scaffold. It has to meet a number of requirements associated with proper selection of mechanical properties, controlled biodegradation rate and structural biomimeticism [19-22]. These factors are particularly important with respect to bone tissue regeneration, since a fully regenerated bone, capable of taking over its natural functions can be formed only if optimal conditions are met. Bone tissue regeneration may be supported either by selecting proper materials for the production of scaffold, or, as many studies suggest, by interacting with external static magnetic field [26-27]. For this reason, a bioresorbable polymer matrix, modified with magnetic particles seems to be a promising step forward in fabricating multifunctional, biomimetic scaffolds for bone tissue regeneration. Its properties and interactions with surrounding tissues could be regulated by strictly controlled external magnetic field.

Do otrzymywania magnetycznych nanokompozytów polimerowych przeznaczonych dla medycyny regeneracyjnej tkanki kostnej do tej pory w roli nanododatku wykorzystywano: hydroksyapatyt dotowany jonami żelaza [28] oraz magnetyt (Fe_3O_4) [14,29-31]. Tlenki żelaza, w szczególności zaś magnetyt (Fe_3O_4) oraz magemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), należą do najczęściej wykorzystywanych cząstek magnetycznych dedykowanych zastosowaniom medycznym. Związane jest to przede wszystkim z ich niską toksycznością, stabilnością w warunkach fizjologicznych, wysokim momentem magnetycznym, a także stosunkowo prostą i tanią preparatyką [32].

Celem niniejszej pracy było wytworzenie oraz charakterystyka magnetycznych nanokompozytów polimerowych na bazie bioresorbowalnego poli(ϵ -kaprolaktonu), w których dodatek stanowił magnetyt o nanometrycznej dyspersji cząstek. Nanokompozyty poli(ϵ -kaprolakton)/ Fe_3O_4 były już wcześniej opisywane w literaturze. Większość tych prac związana jest jednak z otrzymywaniem i charakterystyką nanokompozytów w postaci nano- i mikrocząstek [33-35] oraz trójwymiarowych, porowatych podłoży do regeneracji tkanek z stosunkowo dużą zawartością nanocząstek magnetycznych (5-20%) [14,29,31,36]. Obiektem niniejszych badań są nanokompozyty otrzymywane w formie filmów (membran) polimerowych. Wytworzenie nanokompozytu w formie filmu polimerowego pozwala na jego charakterystykę w zakresie zjawisk istotnych z punktu widzenia zastosowań medycznych tj. wpływ nanododatku na parametry powierzchni, szybkość degradacji oraz właściwości mechaniczne materiału. Właściwości powierzchni materiału, przede wszystkim zaś swobodna energia powierzchniowa oraz jej komponenta polarna, są czynnikami decydującymi o właściwości biologicznych materiałów. Filmy stanowiące przedmiot niniejszych badań zawierają trzy różne zawartości nanododatku: 0,5%, 1% oraz 2%. Zgodnie z teorią tworzyw nanokompozytowych, już niewielka ilość nanowypełniacza skutecznie modyfikuje matrycę polimerową.

Polikaprolakton jest znanym od dawna biozgodnym i resorbowalnym polimerem syntetycznym [37]. Oznacza to, że produkty jego degradacji zostają całkowicie wyeliminowane z organizmu poprzez włączenie ich do naturalnie zachodzących w organizmie procesów metabolicznych. Ze względu na to, a także niską temperaturę topnienia oraz dobrą rozpuszczalność polikaprolakton stanowi dobry materiał wyjściowy do wytwarzania różnego rodzaju biomateriałów tj. mikrosfer, cienkich filmów, nanowłókien czy też 3-wymiarowych porowatych podłoży [37-38].

Jak wiadomo kluczowym parametrem w technologii nanokompozytów polimerowych jest odpowiednia dyspersja nanododatku w matrycy polimerowej. W przypadku modyfikacji polimeru nanocząstką magnetyczną, właściwości magnetyczne nanododatku istotnie wpływają na jego dyspersję w matrycy polimerowej. Jak wykazały wcześniejsze badania przeprowadzone przez K. Nowicką nanocząstki magnetyczne tworzą aglomeraty o różnych formach i wielkościach wpływając na właściwości nanokompozytu [39]. Jakkolwiek aglomeracji nanocząstek można zapobiegać poprzez modyfikację ich powierzchni materiałami zarówno organicznymi, jak i nieorganicznymi, w niniejszej pracy wykorzystano „czysty” magnetyt [40].

Materiały i metody

Jako matrycę polimerową do wytworzenia nanokompozytów wykorzystano biodegradowalny polimer polikaprolakton (M_n 45 000), Sigma-Aldrich. Nanododatek, który stanowiły cząstki magnetytu (tlenku żelaza(II, III)), o rozmiarach <50 nm, pochodził z Sigma-Aldrich. Dichlorometan kupiono w Avantor Performance Materials Poland S.A.

For preparation of a magnetic polymer nanocomposite for bone regenerative medicine, various nanoadditives, such as hydroxyapatite modified with iron ions [28] or magnetite (Fe_3O_4) [14,29-31] were used. Iron oxides, especially magnetite (Fe_3O_4) and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), belong to the most frequently used magnetic particles in medical applications. It is related to their low toxicity, stability under physiological conditions, high magnetic moment as well as relatively simple and cheap preparation techniques [32].

The aim of this paper was fabrication and characterization of magnetic polymer nanocomposites based on a bioresorbable poly(ϵ -caprolactone). As a nanoadditive, magnetite with grain size of nanometric dispersion was used. Poly(ϵ -caprolactone)/ Fe_3O_4 nanocomposites were previously described in literature, however the majority of these papers are associated with preparation and characterization of nanocomposites in form of nano- or microparticles [33-35] and three-dimensional, porous scaffold with relatively high content of magnetic nanoparticles (between 5-20%) [14,29,31,36]. The subjects of the presented research were nanocomposites in form of polymer films (membranes). Formation of nanocomposite in form of polymer film enables characterization of various features, crucial from the viewpoint of medical applications, such as influence of nanoadditives on: surface parameters, degradation rate or mechanical properties of material. Surface parameters, in particular the value of surface free energy and its polar component, determine biological properties of materials. Films, which are the subject of this research, contain three, different amounts of nanoadditive: 0.5%, 1% and 2%. According to the theory of polymer nanocomposites, minor quantity of a nanofiller may successfully modify properties of a polymer matrix.

Polycaprolactone is a well-known biocompatible and bioresorbable synthetic polymer [37]. It means that degradation products of poly(ϵ -caprolactone) are completely eliminated from the organism, by being included into metabolic pathways. This feature, together with its low melting temperature and good solubility comprises a good starting material for fabrication of various types and forms biomaterials e.g. microspheres, thin films, nanofibers and three-dimensional porous scaffolds [37-38].

It is known that good dispersion of a nanoadditive within the polymer matrix is a key parameter in technology of polymer nanocomposites. In the case of polymers modified with magnetic particle, magnetic properties of a nanoadditive significantly influence its dispersion within the polymer matrix. As K. Nowicka demonstrated, magnetic nanoparticles form agglomerates with different sizes and shapes, which impact properties of a final nanocomposite [39]. However, to prevent agglomeration of nanoparticles, modification of their surface by organic and inorganic materials can be applied. In this paper pure magnetite was used [40].

Materials and Methods

A bioresorbable polymer, polycaprolactone (M_n 45 000), Sigma Aldrich, was used as the polymer matrix. The nanoadditive, constituted by magnetite (iron oxide (II,III)), of the size below <50 nm, was obtained from Sigma Aldrich. Dichloromethane was purchased from Avantor Performance Materials Poland S.A.

Do wytworzenia serii nanokompozytów o różnych zawartościach wagowych nanododatku magnetycznego (0%, 0,5%, 1% oraz 2% względem suchej masy polimeru) wykorzystano metodę odlewania folii/odparowywania rozpuszczalnika. Przygotowano 5% roztwór polimeru w dichlorometanie, który następnie homogenizowano przez 24 godziny. Do roztworu polimeru dodano odpowiednią ilość magnetytu i całość mieszano mechanicznie przez godzinę. Po tym czasie roztwór polimeru odlano na szalkę Petriego i pozostawiono na 24 godziny w temp. pokojowej. W celu usunięcia resztek organicznego rozpuszczalnika przygotowane folie polimerowe suszono przez kolejną dobę w 30°C, w warunkach próżni.

Materiały poddano serii badań mających na celu zarówno ich charakterystykę materiałową, jak i dokonanie ich wstępnej oceny pod kątem zastosowań biologicznych. Obserwacje mikroskopowe wykonano zarówno dla dolnej, znajdującej się od strony szklanego podłoża strony materiałów, jak i górnej. Badania powierzchni obejmowały: obserwacje mikroskopowe przeprowadzone przy użyciu mikroskopu Axiovert 40 CFL firmy Zeiss w kontraście fazowym oraz wyznaczanie swobodnej energii powierzchniowej metodą Owensa-Wedta w oparciu o pomiary kąta zwilżania przeprowadzone za pomocą goniometru SA10Mk1 KRUSS. Dla każdego materiału obserwacje mikroskopowe przeprowadzono na trzech próbkach pochodzących z różnych części otrzymanego filmu polimerowego. Energia powierzchniowa, z uwzględnieniem składowej dyspersyjnej oraz polarnej, została wyznaczona w oparciu o pomiary zwilżalności wykonane dla wody dejonizowanej oraz diodometanu przeprowadzone jedynie dla dolnej strony materiałów. Wynik końcowy kąta zwilżania jest średnią arytmetyczną dziesięciu pojedynczych pomiarów.

Badania właściwości magnetycznych, w tym określenie parametrów tj. namagnesowanie nasycenia, remanencja oraz pole koercji, przeprowadzono na magnetometrze z wibrującą próbką firmy Lake Shore Cryotronics, Inc w temp. pokojowej.

W celu wstępnej oceny degradacji nanokompozyty inkubowano przez okres 28 dni w wodzie destylowanej w temp. 37°C dokonując co 7 dni pomiarów pH. Ponadto, po zakończeniu inkubacji porównano masę próbek przed i po inkubacji w celu stwierdzenia ewentualnego ubytku masy. Dla przygotowanych kompozytów, zarówno przed jak i po inkubacji, przeprowadzono także testy wytrzymałości na rozciąganie przy użyciu maszyny wytrzymałościowej ZWICK 1435 z oprogramowaniem TestXpert 8.1 w warunkach jednoosiowego rozciągania. Założona prędkość odkształcenia wynosiła 2 mm/min. Wyniki badań wytrzymałościowych stanowią średnią arytmetyczną pięciu niezależnie przeprowadzonych pomiarów dla każdego typu materiału. Analizę statystyczną wyników wykonano w oparciu o metodę t-Studenta. Poziom ufności wynosił 0,95.

Badania wstępne biogodności dolnej strony przygotowanych materiałów wykonano dla ludzkich osteoblastów NH Ost (Lonza, USA). Z przygotowanego materiału wycięto krążki o średnicy 1,2 cm pasujące do 24-dółkowej płytki hodowlanej (Nunc, Dania). Krążki sterylizowano bezpośrednio przed nałożeniem komórek przez zanurzenie w 70% alkoholu etylowym i naświetlaniu promieniowaniem UV z każdej strony przez 30 min. Komórki hodowano na biomateriałach przez 3 oraz 7 dni. Po tym czasie komórki barwiono oranżem akrydyny przez okres 1 min wprowadzając do dołka hodowlanego 10 µl barwnika o stężeniu 1 mg/ml w medium hodowlanym. Materiały następnie płukano w PBS oraz obserwowano za pomocą mikroskopu OLYMPUS CX41 (Olympus, Japonia) z przystawką fluorescencyjną. Dokumentację fotograficzną przygotowano za pomocą aparatu OLYMPUS E-520.

Method of foil casting/solvent evaporation was applied for the production of a series of nanocomposites with different weight values of the magnetic additive (0%, 0.5%, 1% and 2%) with respect to the dry weight of the polymer. 5% (wt/wt) polymer solution in dichloromethane was prepared, which was next homogenized for 24 hours. Consequently, an appropriate amount of magnetite powder was added to the polymer solution and the whole mixture was stirred for 1 hour. Finally, the solution was cast into a glass Petri dish and kept at a room temperature for 24 hours. Afterwards, the foils were placed in a vacuum dryer, at a temperature of 30°C for 24 h, in order to remove the organic solvent residues.

The obtained materials underwent a series of tests aiming at their material characterization as well as an evaluation of their usability in biological applications. Microscopic examinations of the surfaces of the foils were evaluated for two sides of each sample, i.e. the bottom, remaining in the direct contact with a glass Petri dish and the upper one, remaining in the direct contact with an air, using an optical microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss), operating in a phase contrast mode. For every nanocomposite, observations were conducted on three separate samples deriving from different areas of the polymer film. Surface free energy (basing on Owens-Wendt method) was evaluated basing on wettability contact angle measurements performed using DSA-10 Kruss goniometer. Dispersive and polar components of the surface energy were determined based on the measurements conducted on deionized water and diiodomethane. Each nanocomposite was tested 10 times. The results are expressed as mean values \pm standard deviation (SD).

The examinations of the magnetic properties, including the determination of the parameters, i.e. saturation magnetization, remanence and coercivity, were performed with the use of a vibrating sample magnetometer by Lake Shore Cryotronics, Inc., at a room temperature.

For the purpose of a preliminary evaluation of the degradation, the nanocomposites were incubated for the period of 28 days in distilled water at 37°C and the measurements were performed every 7 days. What is more, after the end of the incubation, the masses of the samples from before and after the incubation were compared in order to determine a possible mass loss. For the prepared nanocomposites, both before and after the incubation, tensile strength tests were also conducted with the use of a universal testing machine ZWICK 1435 with the TestXpert 8.1 software, under the conditions of a uniaxial tension. The assumed deformation rate equalled 2 mm/min. The results of a tensile strength test are the arithmetic means of five independent measurements performed for each type of material. The statistical analysis was based on Student's t-test, with confidence intervals of 0.95.

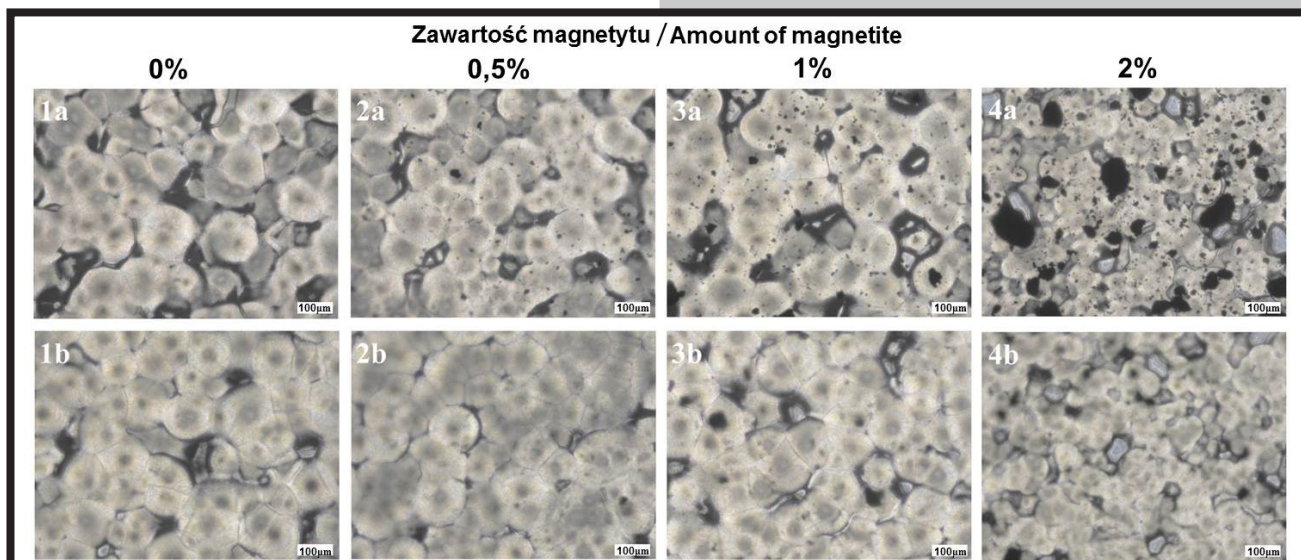
The preliminary examination of the biocompatibility was performed on normal human osteoblasts, NHOst (Lonza, USA). Circles of 1.2 mm diameter were excised from the nanocomposites placed in the matching 24-well plate (Nunc, Denmark) and sterilized directly before seeding the cells, by immersing in 70% ethyl alcohol and exposing each side of the disks to the UV radiation for 30 min. Cells were cultured directly on biomaterials for 3 and 7 days. After this time, the cells were stained for 1 min with acridine orange dye, using 10 µl of stock per well, with concentration 1 mg/ml of medium. Next, materials were rinsed with PBS and observed with the use of an OLYMPUS CXU1 microscope (Olympus, Japan), equipped with a fluorescence attachment. Microphotographic documentation was prepared using OLYMPUS E-520 camera.

Krystalizacja poli(ϵ -kaprolaktonu) jest procesem zależnym od szeregu czynników tj.: warunków prowadzenia procesu, masy cząsteczkowej polimeru, rodzaju rozpuszczalnika oraz nanododatku [41-44]. Obserwacje mikroskopowe (RYS. 1) wytworzonych nanokompozytów wskazują, że wprowadzenie do matrycy polimerowej niewielkiej ilości dodatku w postaci cząstek magnetycznych (0,5-1%) nie wpływa znacząco na rozmiar wykrywalnych sferolitów. Sferolity widoczne na mikrofotografiach: folii z czystego polimeru (RYS. 1: 1a, 1b) oraz nanokompozytów z 0,5% i 1% zawartością magnetytu (RYS. 1: 2a, 2b, 3a, 3b) są duże i dobrze wykształcone, a ich rozrost jest limitowany głównie przez wzrost sferolitów znajdujących się w najbliższym otoczeniu. Widoczne na wszystkich mikrofotografiach ciemne obszary zlokalizowane przy granicach sferolitów odpowiadają miejscom, w których nie stykają się one bezpośrednio z innymi sferolitami tworząc puste przestrzenie, stanowiące swego rodzaju „okna”, przez które można obserwować sferolity zlokalizowane w niższych warstwach filmów polimerowych. W porównaniu do folii odniesienia oraz nanokompozytów zawierających niewielką zawartość dodatku, folie z 2% zawartością nanocząstek magnetycznych (RYS. 1: 4a, 4b) charakteryzują się znacząco mniejszymi sferolitami. Co więcej, na podstawie mikrofotografii nie możliwe jest ściśle wytyczenie granic pomiędzy poszczególnymi sferolitami. Zmniejszenie rozmiarów sferolitów dla nanokompozytów poli(ϵ -kaprolakton)/magnetyt zostało także zaobserwowane przez Wang G.-S. *et al.* [44]. Jakkolwiek metody otrzymywania magnetycznych nanokompozytów polimerowych w obu pracach różnią się od siebie (w przypadku publikacji Wang G.-S. *et al.* zastosowano polimeryzację *in situ*) można przypuszczać, że u podstaw obserwowanej zmiany wielkości sferolitów leżą te same zjawiska. Wprowadzenie do matrycy polimerowej nanododatku jest źródłem heterogenicznej nukleacji krystalizacji poli(ϵ -kaprolaktonu), w której nanocząstki magnetyczne lub też ich aglomeraty, stanowią zarodki krystalizacji, co z kolei prowadzi do powstawania licznych, mniejszych sferolitów. Prawdopodobnie w przypadku nanokompozytów o zawartości 0,5 i 1% nanododatku procesy jednorodnej i niejednorodnej nukleacji krystalizacji konkurują ze sobą, jednakże efekt krystalizacji zarodkującej na nanocząstkach magnetycznych lub ich aglomeratach, ze względu na ich niewielką ilość, nie jest na tyle istotny, aby wywołać zmiany w morfologii filmów polimerowych.

Dodatek nanocząstek magnetycznych obserwowalny jest w postaci czarnych wtrąceń o różnej wielkości jedynie na dolnej stronie otrzymanych nanokompozytów polimerowych (RYS. 1: 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b). Obecność magnetytu jedynie przy dolnej powierzchni materiałów związana jest z opadaniem stosunkowo ciężkich cząstek/aglomeratów po wylaniu zawiesiny nanocząstek magnetytu w polimerze na szalke Petriego. Wraz ze zwiększającą się zawartością magnetytu widoczne są coraz większe, przypadkowo zlokalizowane aglomeraty o nieregularnych kształtach. W przypadku folii o najniższej zawartości nanododatku dominują aglomeraty o rozmiarach rzędu kilku μm (RYS. 1: 2a), z kolei dla folii zawierającej 1% magnetytu coraz liczniejsze są aglomeraty, których wielkość wynosi pomiędzy 10-30 μm (RYS. 1: 3a). Na mikrofotografii folii polimerowej o najwyższej zawartości magnetytu (RYS. 1: 4a) widoczne są aglomeraty o wielkości kilku, kilkudziesięciu, a także powyżej 100 μm . Wynika to z faktu, że wraz z rosnącym zagęszczeniem nanocząstek magnetycznych, coraz silniejsze są występujące pomiędzy nimi oddziaływania powodujące ich wtórną aglomerację, co z kolei prowadzi do heterogenicznej dyspersji nanododatku w obrębie matrycy polimerowej.

Crystallization of poly(ϵ -caprolactone) depends on a number of factors like process conditions, polymer molecular weight, type of dissolvent and nanofiller [41-44]. The microscopic observations (FIG. 1) of the produced nanocomposites revealed that the introduction of a small amount of the additive in the form of magnetic nanoparticles (0.5-1%) into the polymer matrix does not significantly affect size of the observed spherulites. Spherulites visible in the microphotographs of the film made of pure polymer (FIG. 1: 1a, 1b) and nanocomposites with 0.5% and 1% content of magnetite (FIG. 1: 2a, 2b, 3a, 3b), are large and well-formed. Their growth is mainly limited by growth of spherulites in immediate surroundings. Dark areas visible at the borders of the spherulites are created by the spaces with no immediate contact of the spherulites. These empty spaces serve as a kind of windows through which spherulites located in lower layers of polymer films can be observed. In comparison to the reference film and the nanocomposites contacting a small amount of the nanoadditive, the material with 2% content of magnetic particles (Fig. 1: 4a, 4b) is characterized by significantly smaller spherulites. Furthermore, based only on microphotographs, it is impossible to determine the boundaries. Reduction in spherulites' sizes for nanocomposites poly(ϵ -caprolactone)/iron oxide were also observed by Wang G.s. *et al.* [44], where it has been pointed out that the introduction of nanoadditive into polymer matrix is a source of heterogeneous nucleation of crystallization of poly(ϵ -caprolactone). Magnetic nanoparticles or their agglomerates are nuclei, which lead to creating numerous but smaller spherulites [44]. Although the applied fabrication method is different in both works (in the case of Wang G.S.'s paper *in situ* polymerization method was applied), one can assume that the changes in the spherulites sizes can be explained by the similar phenomena. Probably, in the case of nanocomposites with 0.5% and 1% content of magnetite, homogeneous and heterogeneous nucleation of crystallization compete together but effect of crystallization nucleating on magnetic nanoparticles/agglomerates (because of their small amount) is insignificant to induce changes in the morphology of the polymer films.

The agglomerates of magnetic nanoparticles can be seen in the micrographs in the form of black inclusions (FIG. 1: 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b). Magnetite is observed only on the lower side of the nanocomposites. This can be explained by relatively high weight of the particles, causing their immediate sedimentation after the suspension of magnetite nanoparticles in polymer is being poured into a Petri dish. Together with the increase of the % content of magnetite, one can observe growth of randomly located agglomerates with irregular shapes. In the case of polymer film with the lowest content of nanoadditive, agglomerates with sizes of a few μm are dominating (FIG. 1: 2a). For the material containing 1% of nanoadditive, the number of agglomerates between 10-30 μm increases (FIG. 1: 3a) and in the case of the material with highest content of the magnetic nanoparticles (FIG. 1: 4a) the sizes of the agglomerates range from several to more than 100 μm . Increasing sizes of the agglomerates can be attributed to greater and stronger interactions between the magnetic nanoparticles, caused by higher density of those. Thus, their secondary agglomeration and heterogeneous dispersion within the polymer matrix can be observed.



RYS. 1. Mikrofotografie powierzchni filmów polimerowych. Dolna strona: a, górna strona: b.
FIG. 1. Microphotographs of polymer films' surfaces. Bottom side: a, upper side: b.

Właściwości fizykochemiczne powierzchni biomateriału należą do istotnych czynników wpływających na właściwości biologiczne materiałów implantowanych. Jedną z nich jest swobodna energia powierzchniowa (γ^{total}) oraz jej składowa polarna (γ^{p}), które bezpośrednio wpływają na adhezję i proliferację osteoblastów [45-47]. Im wyższa jest wartość swobodnej energii powierzchniowej, tym lepsza jest adhezja komórek do podłoża. Z kolei im niższa jest wartość komponenty polarnej, tym niższa jest aktywność proliferacyjna osteoblastów.

Wartości swobodnej energii powierzchniowej oraz jej komponent dla otrzymanych materiałów zamieszczono w TABELI 1. Bazując na danych podanych w literaturze [45-47] można przypuszczać, że najlepsza adhezja komórek będzie obserwowalna dla folii polimerowych z czystego poli(ϵ -kaprolaktonu), nanokompozytu polimerowego z 1%-wą, 0,5%-wą oraz 2%-wą zawartością nanododatku. Należy jednak zwrócić uwagę, że zmiany w wartości swobodnej energii powierzchniowej spowodowane wprowadzeniem nanododatku nie są zbyt duże. Z kolei wartość składowej polarnej obniża się wraz z rosnącą zawartością nanocząstek magnetycznych, a jej prawie 16-krotny spadek obserwowany jest w przypadku nanokompozytu zawierającego 2% magnetytu.

TABELA 1. Wartości swobodnej energii powierzchniowej (γ^{total}) dla materiału odniesienia oraz magnetycznych nanokompozytów z uwzględnieniem składowej dyspersyjnej (γ^{D}) oraz składowej polarnej (γ^{P}).

TABLE 1. Values of the free surface energy (γ^{total}) for the film made of pure poly(ϵ -caprolactone) and the magnetic nanocomposites, including dispersive (γ^{D}) and polar (γ^{P}) component.

Zawartość magnetytu Amount of magnetite	γ^{total} [mN/m]	γ^{D} [mN/m]	γ^{P} [mN/m]
0%	50.48 ± 1.48	44.67 ± 0.98	5.81 ± 0.50
0.5%	45.81 ± 7.84	43.43 ± 6.79	2.40 ± 1.05
1%	47.53 ± 1.06	45.38 ± 0.87	2.14 ± 0.19
2%	43.46 ± 0.61	43.09 ± 0.51	0.37 ± 0.10

Physicochemical properties of the surface of the biomaterials are the most important factors determining cell's reaction in contact with the biomaterial. Among many features affecting material's biocompatibility, surface free energy (γ^{total}) and its polar (γ^{p}) component, have been reported by many studies to have a direct impact on the adhesion and proliferation of the osteoblasts [45-47]. The higher is the value of the surface free energy the better is the adhesion of osteoblasts to the substrate. The smaller is the value of the polar component the lower is the proliferative activity of the osteoblasts.

Values of the surface free energy of the obtained materials are given in TABLE 1. Based on the relations found in the literature [45-47], it can be assumed that the best adhesion of cells should be observed for the polymer film made of pure poly(ϵ -caprolactone) and nanocomposites with: 1%, 0.5% and 2% content of magnetite. It should be noted that although the changes in the value of the surface free energy, caused by the introduction of the nanoadditive into polymer matrix, are not significant, the value of the polar component of the surface free energy decreases consequently, when the content of nanofiller increases, reaching substantial, nearly 16-fold decrement for the nanocomposite with 2% amount of magnetite. Such drastic changes in the polar component of the surface energy might indicate presence of the nanoadditive also in the form of nanodispersion, consequently interacting with the polymer chains, thus changing structure of the nanocomposites' surfaces.

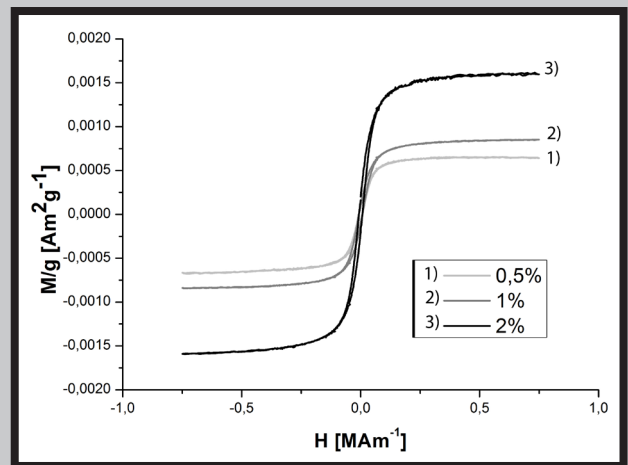
The values of coercivity and remanence (TABLE 2) as well as the shape of the hysteresis loop (FIG. 2) of the nanometric magnetite point to a ferrimagnetic character of both the raw nanoadditive and the prepared nanocomposites. Received values of saturation magnetization for magnetic nanoparticles, referred to as experimental data are found to be close to the literature data for pure magnetite [48-50]. As a result of introducing magnetic particles into the polymer matrix, the value of coercivity remains practically unchanged. The parameters which undergo significant changes are: the magnetic remanence and the saturation magnetization. This is caused by the dependence between the values of both parameters and the density of the magnetic particles, understood as the amount of magnetic particles per unit of volume. Values of the remanence and saturation magnetization were calculated assuming that experimental data obtained for magnetite are 100%. These values are referred to as calculated values in TABLE 2.

TABELA 2. Parametry magnetyczne magnetytu oraz nanokompozytów.
TABLE 2. Magnetic parameters of magnetite and nanocomposites.

	Pole koercji Coercive field strength [kAm ⁻¹]			Remanencja Remanence [Am ² kg ⁻¹]			Namagnesowanie nasycenia Saturation magnetization [Am ² kg ⁻¹]		
	Zawartość magnetytu Amount of magnetite			Zawartość magnetytu Amount of magnetite			Zawartość magnetytu Amount of magnetite		
	0.5 %	1 %	2 %	0.5 %	1 %	2 %	0.5 %	1 %	2 %
PCL/Magnetyt PCL/Magnetite	87 ± 3	93 ± 1	90 ± 3	0.080 ± 0.003	0.105 ± 0.004	0.193 ± 0.004	0.68 ± 0.06	0.86 ± 0.02	1.65 ± 0.04
Wartość obliczona Calculated Value				0.045	0.091	0.182	0.38	0.76	1.52
Magnetyt Magnetite	94 ± 2			9.1 ± 0.1			76.2 ± 1.3		

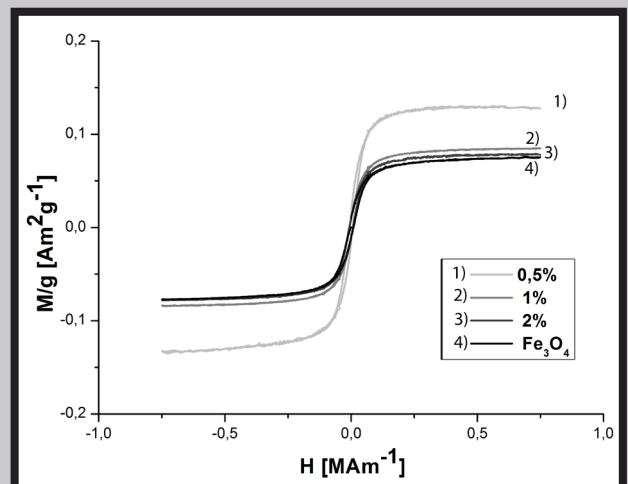
Ponadto zmiany wartości energii swobodnej powierzchni i komponenty polarnej mogą świadczyć o zachodzących zmianach budowy powierzchni, będących konsekwencją oddziaływania łańcuchów polimerowych z nanocząstkami magnetytu. Na tej podstawie można przypuszczać, że jakkolwiek na mikrofotografiach obserwowane są różnej wielkości aglomeraty magnetytu, to część nanododatku pozostaje niezaglomerowana, w dyspersji nanometrycznej.

Wartość pola koercji, pozostałości magnetycznej nanometrycznego magnetytu (TABELA 2) oraz kształt pętli histerezy (RYS. 2) wskazują na ferrimagnetyczny charakter zarówno samego nanododatku jak i przygotowanych nanokompozytów polimerowych. Otrzymana wartość namagnesowania nasycenia dla nanocząstek magnetycznych zbliżona jest do wartości podanych w literaturze dla magnetytu [48-50]. Po wprowadzeniu do matrycy polimerowej cząstek magnetycznych wartość pola koercji pozostaje niezmienną. Parametrami, które w istotny sposób podlegają zmianom są remanencja i namagnesowanie nasycenia. Spowodowane jest to bezpośrednią zależnością pomiędzy wartością obu tych parametrów, a gęstością cząstek magnetycznych rozumianą jako ilość cząstek magnetycznych przypadającą na jednostkę objętości. Ponadto, obliczono wartość remanencji oraz namagnesowania nasycenia przy założeniu, że wartości eksperymentalne otrzymane dla magnetytu stanowią 100% (wartość ta jest oznaczona w TABELI 2, jako „wartość obliczona”). W przypadku nanokompozytów o zawartościach 1 i 2% pomiędzy wartościami teoretycznymi, a eksperymentalnymi nie ma istotnych różnic. Wartości te jednak znacznie od siebie odbiegają dla folii polimerowej o 0,5%-owej zawartości nanododatku. Rozważania te znajdują odzwierciedlenie w pętlach histerezy otrzymanych dla nanokompozytów, w przypadku których namagnesowanie nasycenie zostało przeliczone na masę magnetytu w badanej próbce (RYS. 3). Pętli histerezy dla nanokompozytów 1 i 2% są zbliżone, co do wartości, do pętli histerezy dla nanododatku, natomiast folia polimerowa zawierająca 0,5% nanododatku charakteryzuje się pętlą histerezy o wyraźnie wyższym namagnesowaniu nasycenia. Wartość namagnesowania nasycenia jest pochodną dwóch konkurujących ze sobą oddziaływań: oddziaływań wymiennych oraz dipolowych [51]. Obecność silnych oddziaływań wzajemnych powoduje równoległe porządkowanie się momentów magnetycznych zwiększając wartość namagnesowania nasycenia. Oddziaływania dipolowe z kolei dążą do antyrównoległego ustawienia momentów magnetycznych obniżając tym samym wartość namagnesowania nasycenia.



RYS. 2. Pętli histerezy otrzymanych nanokompozytów polimerowych (namagnesowanie nasycenie w przeliczeniu na masę próbki).

FIG. 2. Hysteresis loops of fabricated nanocomposites (saturation magnetization calculated through mass of sample).



RYS. 3. Pętli histerezy nanododatku (magnetytu) oraz nanokompozytów (namagnesowanie nasycenie przeliczone na masę magnetytu).

FIG. 3. Hysteresis loops of nanoaddition and fabricated nanocomposites (saturation magnetization calculated through mass of magnetite).

Oddziaływania dipolowe są jednak oddziaływaniami bliższego zasięgu, co powoduje, że w materiałach o niewielkiej gęstości cząstek (w tym przypadku nanokompozytu o zawartości 0,5% dodatku) nie przeciwdziałają efektywnie oddziaływaniom wymiennym, czego konsekwencją jest wyższa wartość namagnesowania nasycenia niż w przypadku magnetytu oraz nanokompozytów o wyższych zawartościach cząstek magnetycznych. Różnice pomiędzy wartościami eksperymentalnymi a obliczonymi mogą być także spowodowane niejednorodnym rozproszaniem nanocząstek magnetycznych w obrębie matrycy, a także występowaniem wzajemnych oddziaływań pomiędzy cząstkami magnetycznymi z różnych obszarów folii w kuwecie pomiarowej. Mimo to można stwierdzić, że w przypadku nanokompozytów o wyższej zawartości nanocząstek magnetycznych, wartość namagnesowania nasycenia zmienia się proporcjonalnie do zawartości nanocząstek magnetycznych. Podobną zależność w swojej pracy zaobserwował także Kim J.-J. et al. [31].

Rozważając kształt pętli histerezy (RYS. 3) otrzymanych dla nanododatku oraz magnetycznych folii polimerowych można stwierdzić, że mają one jednakowy przebieg. Wskazuje to na obecność oddziaływań tego samego rodzaju pomiędzy nanocząstkami zarówno w magnetycznym proszku, jak i materiałach nanokompozytowych. Sugeruje to, że matryca polimerowa jest jedynie neutralnym nośnikiem dla nanocząstek magnetytu, niewplywającym na ich właściwości magnetyczne.

Przeprowadzona inkubacja w temp. 37°C pozwoliła na wstępne określenie podatności na degradację wytworzonych materiałów nanokompozytów w porównaniu do filmu z poli(ϵ -kaprolaktonu). Zaobserwowano sukcesywny spadek pH wody destylowanej, w której inkubowano próbki wraz z trwaniem inkubacji (TABELA 3). Dla magnetycznych kompozytów pH wody było nieznacznie niższe w porównaniu do pH wody, w której inkubowano folię wykonaną z czystego polimeru. W wyniku inkubacji nie zaobserwowano znaczącego ubytku masy badanych materiałów (TABELA 4). Różnica pomiędzy masą przed i po inkubacji zbliżona jest do błęd pomiarowego.

In the case of nanocomposites with 1% and 2% content of magnetite, there are no significant differences between calculated and experimental data. However, a significant difference in the calculated value can be observed for the polymer film with 0.5% amount of magnetite. These results find reflection in hysteresis loops for fabricated nanocomposites, in which saturation magnetizations were calculated taking into account mass of magnetite in tested sample (FIG. 3). Hysteresis loops for nanocomposites 1 and 2 % are close in value to hysteresis loop of nanoadditive but the polymer film with 0.5% content of nanoadditive shows hysteresis loop with significant higher saturation magnetization. Two competing interactions influence the value of saturation magnetization: dipole-dipole and exchange [51]. Presence of strong exchange interactions causes parallel arrangement of magnetic moments, which increase saturation magnetization, whereas dipole-dipole interactions induce anti-parallel arrangement of magnetic moments, thus decreasing the value of saturation magnetization. Dipole-dipole interactions are short-range and for these reasons, in the case of materials with low density of magnetic particles (as nanocomposite with 0.5% content of nanoadditive), these cannot effectively counteract the influence of exchange interactions. As a result, the value of saturation magnetization increases. The differences between experimental and calculated data may be caused by heterogeneous dispersion of magnetic nanoparticles within polymer matrix and interactions between particles from various parts of materials in measurement cell. Despite that, it can be stated that the nanocomposites with higher content of magnetic nanoadditive, possess value of saturation magnetization proportional to content of magnetic nanoparticles. Similar dependence was also observed by Kim J.-J. et al. [31].

Considering the shapes of hysteresis loop (FIG. 3) obtained for nanoadditive and fabricated magnetic polymer film, it can be concluded that they have equal courses. It indicates the presence of the same type of interactions both in magnetic powder and in nanocomposite materials. It may suggest that polymer matrix is only a neutral carrier for magnetite nanoparticles and is not affecting their magnetic properties.

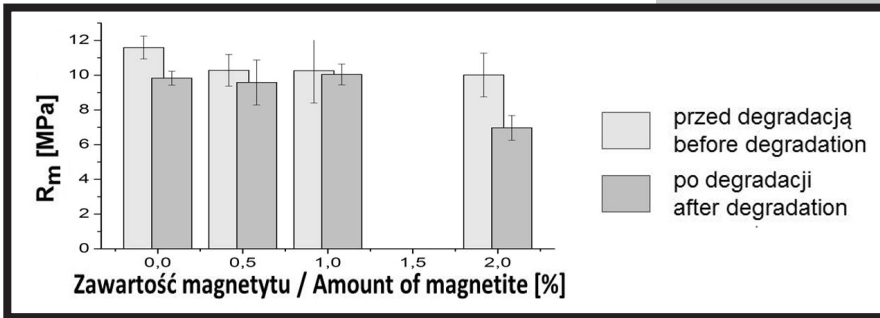
The incubation performed at 37°C made it possible to preliminarily determine the degradation rate of the produced nanocomposite materials in comparison to film made of poly(ϵ -caprolactone). A successive pH drop of the distilled water used to incubate the samples was observed with the incubation progress (TABLE 3). The pH of the water used to incubate the samples was slightly lower for the nanocomposites than for pure poly(ϵ -caprolactone). No significant mass loss of the examined materials was observed as a result of the incubation as the observed differences fall within the value of the measuring error (TABLE 4). The difference in the masses before and after the incubation is close to the measuring error.

TABELA 3. Wartość pH w czasie trwania inkubacji.
TABLE 3. pH value during the duration of incubation.

Zawartość magnetytu Amount of magnetite	pH				
	0 dzień 0 days	7 dzień 7 th day	14 dzień 14 th day	21 dzień 21 st day	28 dzień 28 th day
0 %	5.79	5.43	4.94	4.86	4.80
0.5%	5.77	5.42	4.68	4.71	4.51
1%	5.77	5.30	4.65	4.56	4.44
2%	5.64	5.27	4.59	4.48	4.36

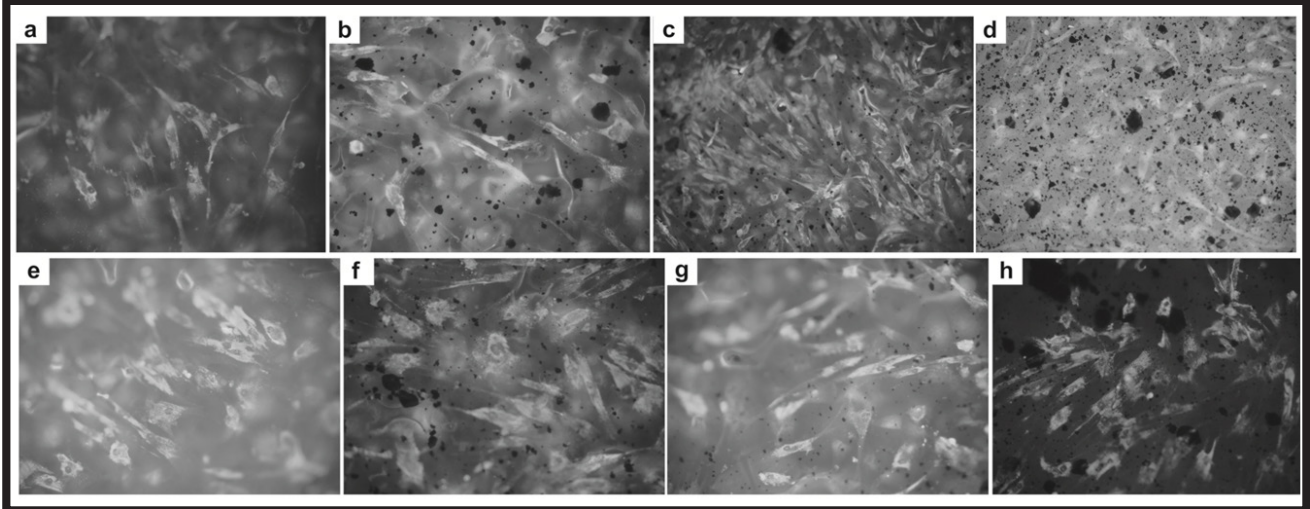
TABELA 4. Masa próbek przed i po inkubacji.
TABLE 4. Weight of the samples before and after the incubation.

	Zawartość magnetytu / Amount of magnetite			
	0%	0.5%	1%	2%
	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]	Masa próbki Weight of sample [g]
Przed inkubacją Before incubation	0.185	0.272	0.268	0.272
Po inkubacji After incubation	0.183	0.271	0.266	0.269
Δ	0.002	0.001	0.002	0.003



RYS. 4. Wytrzymałość na rozciąganie folii z poli(ϵ -kapolaktonu) oraz magnetycznych nanokompozytów przed i po inkubacji w 37°C.

FIG. 4. Tensile strength of film made of poly(ϵ -caprolactone) and nanocomposites before and after incubation.



RYS. 5. Hodowle osteoblastów na folii z PCL-u (a: 3 dni, e: 7 dni) i nanokompozytów o 0,5% (b: 3 dni, f: 7 dni), 1% (c: 3 dni, g: 7 dni) oraz 2% (d: 3 dni, h: 7 dni) zawartości magnezytu.

FIG. 5. Cultures of osteoblasts on foil made of PCL (a: 3 days, e: 7 days) and nanocomposites 0.5% (b: 3 day, f: 7 days), 1% (c: 3 days, g: 7 days) and 2% (d: 3 days, h: 7 days).

Wyniki badań właściwości mechanicznych przeprowadzonych dla materiałów przed degradacją wykazały niewielki spadek wytrzymałości na rozciąganie po wprowadzeniu cząstek magnetycznych do matrycy polimerowej (RYS. 4). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że za wyjątkiem nanokompozytu zawierającego 1% nanododatku obserwowane zmiany, jakkolwiek niewielkie, są istotne statycznie. Największy spadek wytrzymałości, o 1,58 MPa, obserwowany jest w przypadku nanokompozytu polimerowego o zawartości 2% cząstek magnetycznych. Wytrzymałości na rozciąganie dla kompozytów 0,5% oraz 1% i wynoszą odpowiednio 10,28 MPa i 10,26 MPa. Należy jednak pamiętać, że ze względu na obecność licznych, dużych aglomeratów nanocząstek, wyniki badań mechanicznych nie są do końca miarodajne.

Po inkubacji materiałów przez 28 dni w temp. 37°C zaobserwowano istotny statycznie spadek wytrzymałości na rozciąganie w przypadku dwóch materiałów: folii wykonanej z czystego poli(ϵ -kapolaktonu) oraz folii o najwyższej zawartości nanododatku, przy czym zmiana dla nanokompozytu polimerowego jest znacząco większa. Na podstawie badań wytrzymałościowych można przypuszczać, że biodegradacja biomateriałów będzie rozpoczynać się od miejsc, w których obecne są aglomeraty nanocząstek magnetycznych, a tym samym czas biodegradacji materiałów o wyżej zawartości nanododatku będzie krótszy w porównaniu do nanokompozytów zawierających mniejszą ilość magnezytu, a także czystego poli(ϵ -kapolaktonu). Biodegradacja matrycy polimerowej materiału zależy od rodzaju polimeru i jego budowy chemicznej, hydrofobowości, stopnia krystaliczności, długości łańcuchów polimerowych, a także porowatości, rozwinięcia powierzchni, geometrii oraz metody otrzymywania [34].

The results of the strength tests show a slight tensile strength decrease after the introduction of the magnetic particles into the polymer matrix (FIG. 4). Statistical analysis shows that, except of nanocomposite with 1% content of nanoaddition, although being small, the reported changes are significant. The biggest decrease of tensile strength, equal to 1.58 MPa, is observed for nanocomposite containing 2% of magnetic particles. Tensile strengths for nanocomposites with 0.5% and 1% content of nanomagnetite are 10.28 MPa and 10.26 Pa, respectively. It must be noted, that due to the presence of numerous, huge agglomerates, the results of mechanical tests should be treated as purely indicative.

After the incubation for 28 days in 37°C, the significant decrease in tensile strength was observed for both the pure poly(ϵ -caprolactone) film and the nanocomposite with the highest content of the nanoaddition, with more significant change in the case of the latter. Thus, it can be assumed that the degradation of fabricated materials starts from places where the agglomerates of magnetic nanoparticles are present, thus biodegradation time of nanocomposites with higher content of magnetic particles should be shorter, compared to both nanocomposite with minor amount of nanofiller and pure poly(ϵ -caprolactone). Biodegradation of material's polymer matrix depends also on a type of polymer, its chemical composition, hydrophobicity, crystallinity, length of polymer chains and porosity, surface area, geometry and fabrication method of material [34].

Zarówno czysty poli(ϵ -kapolakton) jak i nanokompozyty okazały się nietoksyczne dla komórek (RYS. 5). Na mikro fotografiach widoczne są nie tylko dobrze rozplaszczone osteoblasty, lecz także większe aglomeraty cząstek magnetycznych w postaci czarnych obiektów zlokalizowanych poniżej komórek. Prawidłowy kształt komórek i ich równomierne rozmieszczenie na powierzchni wszystkich folii sugerują, że wytworzone materiały sprzyjają adhezji komórek, umożliwiając ich dalszą proliferację oraz różnicowanie. Należy jednak wziąć pod uwagę fakt, że przeprowadzone badania biologiczne miały charakter badań wstępnych, a ich celem było jakościowe określenie cytotoksycznego wpływu materiałów na komórki kostne. W celu zbadania efektywności wspomagania regeneracji tkanki kostnej przez magnetyczne nanokompozyty polimerowe, planowane są dalsze badania zarówno przy absencji jak i w obecności zewnętrznego pola magnetycznego.

Wnioski

Korzystając z prostej metody odlewania folii/odparowania rozpuszczalnika wytworzono serie magnetycznych nanokompozytów o różnej zawartości cząstek magnetycznych. Na podstawie otrzymanych wyników badań można stwierdzić, że magnetyczny nanododatek wykazuje wysoką tendencję do aglomeracji. Zarówno magnetyt jak i nanokompozyty polimerowe wykazują właściwości ferromagnetyczne. Namagnesowania nasycenia nanokompozytów polimerowych o wyższej zawartości nanododatku jest wprost proporcjonalne do ilości nanocząstek magnetycznych wprowadzonych do matrycy polimerowej. Zawartość magnetytu poniżej 2% nie wpływa znacząco na degradację materiału. Duża ilość aglomeratów nanocząstek w obrębie matrycy polimerowej stanowi defekt materiału i poprzez koncentrację naprężeń przyczynia się do obniżenia właściwości mechanicznych materiału. Wstępne badania biologiczne nie wykazały cytotoksycznego wpływu na komórki, co pozwala sądzić, że wytworzone materiały mogą znaleźć zastosowanie w terapii dostarczania leków nośnikami magnetycznymi, a także stanowić tworzywo do konstrukcji podłoża o biometrycznych z tkanką kostną właściwościach fizycznych.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach prac statutowych nr 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH Akademii Górniczo-Hutniczej.

As proven by the direct contact tests, both pure poly(ϵ -caprolactone and magnetic nanocomposites are biocompatible (FIG. 5). In the microscopic photographs, well-flattened cells together with magnetic particles in the form of black objects, located below the cells, can be seen. Proper shapes and uniform distribution of cells in the whole surface of the foils suggests that fabricated materials favor the adhesion of the cells, allowing for their further proliferation and differentiation. It should be taken into account that performed biological studies are only preliminary and aimed as trial investigation of potential toxic influence of fabricated materials on osteoblast cells. In order to investigate the efficiency of magnetic composites to support bone tissue regeneration, further studies are planned, both in absence and presence of external magnetic field.

Conclusions

With the use of the simple method of foil casting/solvent evaporation, a series of magnetic nanocomposites with different % wt. contents of magnetic particles were produced. Basing on obtained results it can be concluded that magnetic nanoaddition has high tendency to agglomerate. Both pure magnetite and magnetic nanocomposites have ferrimagnetic properties. Saturation magnetization of magnetic nanocomposites with higher content of magnetic particles is proportional to content of magnetite introduced into the polymer matrix. Content of magnetite below 2% does not influence significantly rate of degradation of the materials. However, larger amount of nanoparticles favors formation of their agglomerates, treated as a defect of materials, which may cause stress concentration, consequently decreasing mechanical properties of the material. Preliminary biological studies demonstrated biocompatibility of fabricated materials, which allows for the thesis that these materials could find their application in drug delivery systems or may be used as a promising material for constructing biomimetic bone tissue scaffold.

Acknowledgements

This work was supported by AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Engineering – statutory works No. 11.11.160.616.

Piśmiennictwo

- [1] Sanchez C., Belleville P., Popall M., Nicole L.: Applications of advanced hybrid organic-inorganic nanomaterials: from laboratory to market. *Chemical Society Reviews* 40 (2011) 696-753.
- [2] Cushen M., Kerry J., Morris M., Cruz-Romero M., Cummins E.: Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology* 24 (2012) 30-46.
- [3] Bhushan B., Luo D., Schrickler S.R., Sigmund W., Zauscher S., *Handbook of Nanomaterials Properties*. Berlin: Springer-Verlag 2014
- [4] Trahms L., *Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles Lect. Notes Phys.* 763 (2009) 327-358.
- [5] Lou L., You K., Zhang Z., Li B., Zhu J., Wang Y., Huang R., Zhu Z.: Functionalized magnetic-fluorescent hybrid nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale* 3 (2011) 2315-2323.
- [6] Liu J., Wang L., Cao J., Huang Y., Lin Y., Wu X., Wang Z., Zhang F., Xu X., Lu G.: Functional investigations on embryonic stem cells labeled with clinically translatable iron oxide nanoparticles. *Nanoscale* 6 (2014) 9025-9033.
- [7] Cui Y-R., Hong C., Zhou Y-L., Li Y., Gao X-M., Zhang X-X.: Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell $Fe_3O_4@Au$ magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85 (2011) 1246-1252.

References

- [8] He J., Huang M., Wang D., Zhang Z., Li G.: Magnetic separation techniques in a sample preparation for biological analysis: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2014) In press
- [9] Sharifi I., Shokrollahi H., Amiri S.: Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 324 (2012) 903-915.
- [10] Laurent S., Dutz S., Häfeli U. O., Mahmoudi M.: Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advanced in Colloid and Interface Science* 166 (2011) 8-23.
- [11] Sun C., Lee J. S.H., Zhang M.: Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (2008) 1252-1265.
- [12] Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: Magnetic particles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research* 62 (2010) 144-149.
- [13] Mangual J.O., Avilés M.O., Ebner A.D., Ritter J.A.: In vitro study of magnetic nanoparticles as the implant for implant assisted magnetic drug targeting. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 323 (2011) 1903-1908.

- [14] Singh R.K., Patel K.D., Lee J.H., Lee E.-J., Kim J.-H., Kim T.-H., Kim H.-W.: Potential of Magnetic Nanofiber Scaffolds with Mechanical and Biological Properties Applicable for Bone Regeneration. *PLoS ONE* 9 (4): e91584.
- [15] Panseri S., Cunha C., D'Alessandro T., Sandri M., Russo A., Giavaresi G., Marcacci M., Hung C.T., Tampieri A.: Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation *In Vitro* Using Osteoblast-Like Cells and *In Vivo* in a Bone Defect. *PLoS ONE* 7 (6): e38710.
- [16] Bock N., Riminucci A., Dionigi C., Russo A., Tampieri A., Landi E., Goranov V.A., Marcacci M., Dediu V.: A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 786-796.
- [17] Meng J., Xiao B., Zhang Y., Liu J., Xue H., Lei J., Kong H., Huang Y., Jin Z., Gu N., Xu H.: Super-paramagnetic responsive nanofibrous scaffolds under static magnetic field enhance osteogenesis for bone repair *in vivo*. *Scientific Reports* 3: 2655.
- [18] Daar A.S., Greenwood H.L.: A proposed definition of regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 1 (2007) 179-184.
- [19] Hutmacher D.W.: Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.
- [20] Mitra J., Tripathi G., Sharma A., Basu B.: Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response. *RSC Advances* 3 (2013) 11073-11094.
- [21] Eglin D., Mortisen D., Alini M.: Degradation of synthetic polymeric scaffolds for bone and cartilage tissue repairs. *Soft Matter* 5 (2009) 938-947.
- [22] Yu X., Xia Z., Wang L., Peng F., Jiang X., Huang J., Rowe D., Wei M.: Controlling the structural organization of regenerated bone by tailoring tissue engineering scaffold architecture. *Journal of Materials Chemistry* 22 (2012) 9721-9730.
- [23] Bongio M., van der Beucken J.J.P., Leeuwenburgh S.C.G., Jansen J.A.: Development of bone substitute materials: from 'biocompatible' to 'instructive'. *Journal of Materials Chemistry* 20 (2010) 8747-8759.
- [24] Barradas A.M.C., Yuan H., van Blitterswijk C.A., Habibovic P.: Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties experimental models and biological mechanism. *European Cells and Materials* 21 (2011) 407-429.
- [25] Albrektsson T., Johansson C.: Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal* 10 (2001) 96-101.
- [26] Xu H.-Y., Gu N.: Magnetic responsive scaffolds and magnetic fields in bone repair and regeneration. *Frontiers of Materials Science* 8 (2014) 20-31.
- [27] Kotani H., Kawaguchi H., Shimoaka T., Iwasaka M., Ueno S., Ozawa H., Nakamura K., Hoshi K.: Strong Static Magnetic Field Stimulates Bone Formation to a Definite Orientation *In Vitro* and *In Vivo*. *Journal of bone and mineral research* 17 (2002) 1814-1821.
- [28] Gloria A., Russo T., D'Amora U., Zeppetelli S., D'Alessandro T., Sandri M., Bañobre-López M., Piñero-Redondo Y., Uhlarz M., Tampieri A., Rivas J., Herrmannsdörfer T., Dediu V.A., Ambrosio L., De Santis R.: Magnetic poly(ϵ -caprolactone)/iron-doped hydroxyapatite nanocomposites substrate for advanced bone tissue engineering. *Interface* 10 (2013), 20120833.
- [29] De Santis R., Gloria A., Russo T., D'Amora U., Zeppetelli S., Dionigi C., Sytcheva A., Herrmannsdörfer T., Dediu V., Ambrosio L.: A Basic Approach Toward the Development of Nanocomposite Magnetic Scaffolds for Advanced Bone Tissue Engineering. *Journal of Applied Polymer Science* 122 (2011) 3599-3605.
- [30] Kannarkat J.T., Battogtokh J., Philip J., Wilson O. C., Mehl P. M.: Embedding of magnetic nanoparticles in polycaprolactone nanofiber scaffolds to facilitate bone healing and regeneration: *Journal of Applied Physics* 107 09B307 (2010).
- [31] Kim J.-J., Singh R. K., Seo S.-J., Kim T.-H., Kim J.-H., Lee E.-J., Kim H.-W., Magnetic scaffolds of polycaprolactone with functionalized magnetite nanoparticles: physicochemical, mechanical, and biological properties effective for bone regeneration. *RSC Advances* 4 (2014) 17325-17336.
- [32] Figuerola A., Di Corato R., Manna L., Pellegrino T.: From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical application. *Pharmacological Research* 62 (2010) 126-143.

- [33] Yang J., Park S.-B., Yoon H.-G., Huh Y.-M., Hamm S.: Preparation of poly ϵ -caprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. *International Journal of Pharmaceutics* 324 (2006) 185-190.
- [34] Dash T. K., BadireenathKonkimalla V.: Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drugs delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* 158 (2012) 15-33.
- [35] Hamoudeh M., Fessi H.: Preparation, characterization and surface study of poly-epsilon caprolactone magnetic microparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 300 (2006) 584-590.
- [36] Świętek M., Tokarz W., Tarasiuk J., Wroński S., Błażewicz M.: Magnetic Polymer Nanocomposite for Medical Applications. *Acta Physica Polonica A* 125 (2014) 891-894.
- [37] Woodruff M. A., Hutmacher D. W.: The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217-1256.
- [38] Dash T.K., Konkimalla V. B.: Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *Journal of Controlled Release* 158 (2012) 15-33.
- [39] Nowicka K.: Badania polimerowych kompozytów magnetycznych dla potrzeb inżynierii biomedycznej: rozprawa doktorska. Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów (2012) Kraków.
- [40] Wu W., He Q., Jiang C.: Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Research Letters* 3 (2008) 397-415.
- [41] Nowicka K., Figiel H., Błażewicz M.: Preparation and characterization of polysulfone/magnetite nanocomposites – Polychar 19: World Forum on Advanced Materials: 2011, Nepal: book of abstracts – p. 232.
- [42] Nowicka K., Figiel H., Tokarz W., Sołtysiak E., Błażewicz M.: Nanokompozyty magnetyczne dla zastosowań biomedycznych – Magnetycznanocomposite for medical applications, *Przetwórstwo Tworzyw*; ISSN 1429-0472. – 1 (2013) 27-31.
- [41] Chen H.-L., Li L.-J., Ou-Yang W.-C., Hwang J. C., Wong W.-Y.: Spherulitic crystallization behaviour of poly(ϵ -caprolactone) with a wide range of molecular weight. *Macromolecules* 30 (1997) 1718-1722.
- [42] Tang Z. G., Black R. A., Curran J. M., Hunt J. A., Rhodes N. P., Williams D. F.: Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ϵ -caprolactone] films. *Biomaterials* 25 (2004) 4741-4748.
- [43] Wang G.-s., Wang L., Wei Z.-y., Sang L., Dong X.-f., Qi M., Chen G., Chang Y., Zhang W.-x.: Synthesis and characterization of poly(ϵ -caprolactone)/Fe₃O₄ nanocomposites by *in situ* polymerization. *Chinese Journal of Polymer Science* 31 (2013) 1011-1021.
- [44] Wang G.-s., Wei Z.-y., Sang L., Chen G.-y., Zhang W.-x., Dong X.-f., Qi M.: Morphology, crystallization and mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone)/graphene oxide nanocomposites. *Chinese Journal of Polymer Science* 31 (2013) 1148-1160.
- [45] Hallab N. J., Bundy K. J., O'Connor K., Moses R. L., Jacobs J. J.: Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion. *Tissue Engineering* 7 (2001) 55-71.
- [46] Kubies D., Himmlová L., Riedel T., Chánová E., Balík K., Doudřová M., et al.: The Interaction of Osteoblast With Bone-Implant Materials: 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. *Physiological Research* 60 (2011) 95-111.
- [47] Noro A., Kaneko M., Murata I., Yoshinari M.: Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zircona (tetragonal zirconapoly crystal). *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2012:00B:000-000.
- [48] Goya G. F., Berquó T. S., Fonseca F. C.: Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics* 94 (2003) 3520-3528.
- [49] Nishio K., Ikeda M., Gokon N., Tsubouchi S., Narimatsu H., Mochizuki Y., Sakamoto S., et al.: Preparation of size-controlled (30-100 nm) magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310 (2007) 2408-2410.
- [50] Shen L., Qiao Y., Guo Y., Men S., Yang G., Wu M., Zhao J.: Facile co-precipitation synthesis of shape-controlled magnetite nanoparticles. *Ceramics International* 40 (014) 1519-1524.
- [51] Pękała M.: Eksperymentalne metody magnetochemii. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, 2013. ISBN: 978-83-235-1044-4.

INTEGRIN αv SIGNALING INFLUENCES PHENOTYPE AND MATURATION OF PRIMARY HUMAN OSTEOBLASTS ON ALUMINA SURFACE

EDYTA WRÓBEL^{1*}, MAŁGORZATA WITKOWSKA-ZIMNY¹, PIOTR MRÓWKA¹, ELIZA GŁODKOWSKA-MRÓWKA²

¹ DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, 5 CHAŁUBIŃSKIEGO ST., 02-004 WARSAW, POLAND

² DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY, CENTER OF BIOSTRUCTURE RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, 1A BANACHA ST., 02-097 WARSAW, POLAND

* E-MAIL: EDYTA.WROBEL@WUM.EDU.PL

Abstract

Due to the growing interest in stem cells application in tissue engineering the better understanding of primary human osteoblasts behavior in vitro, on biomaterial surface, is required. Among other molecules integrins may be taken into account as being involved in these phenomena. Integrins are a family of cell adhesion receptors, which may regulate many cellular functions e.g., adhesion, motility, phenotype and cell maturation. The aim of this study was to determine the effect of the biomaterial surfaces and αv integrin signaling pathway on the behavior, phenotype and maturation of human osteoblasts in vitro. Human bone derived cells (HBDCs) obtained from adult femoral bone fragments were cultured on both alumina disks and tissue culture polystyrene (TCPS) dishes. After 7, 14, and 21 days of culture, localization and mRNA expression level of αv integrin subunits and BGLAP (osteocalcin) on polystyrene were analyzed in addition, we treated the cell cultures with monoclonal antibodies against human αv integrin to block its ligand-binding activity, on both alumina and TCPS substrates. We found that the αv integrin was present in focal contacts and cell cytoplasm at subsequent stages of cell maturation and the level of αv integrin mRNA was the highest in mature osteoblasts. Blocking αv integrin transduction pathway caused changes in cell activity and morphology, decreased cells proliferation on TCPS and reduced expression of alkaline phosphatase (ALP) on both materials. The results suggest that αv integrin is involved as an important receptor facilitating osteogenic differentiation.

Keywords: integrin, human bone derived cells, osteogenic differentiation, cell adhesion, biomaterial

[*Engineering of Biomaterials* 127 (2014) 33-39]

Introduction

Tissue engineering (TE) is a technique involving a combination of cells, biomaterials and biochemical or physicochemical factors to develop a construct used to improve or replace biological tissue. One of the most rapidly developing fields of medicine vividly interested in TE discoveries is reconstructive surgery, especially orthopaedics.

In many instances orthopaedic surgery requires replacement of destroyed tissue; hence there is a growing need to develop a method to produce bone tissue *in vitro*. However, while more and more biomaterials with great properties for bone TE are designed, differentiation and maturation of osteoblasts still remain one of the greatest obstacles on a way to develop fully functional bone product.

Cell adhesion is a fundamental phenomenon, which supports the cell to sustain its structure, profoundly influences cell growth, differentiation, and migration as well as tissue morphogenesis, integrity and repair. Bone cell adhesion to extracellular matrix (ECM) directly influences cell spreading and growth, development of osteoblasts phenotype and bone tissue formation. Adhesion of bone cells onto the surface of the material plays a crucial role in host-implant interactions in biomaterial and tissue engineering. Osteoblasts interact with the surface through integrin membrane receptors binding first to proteins adsorbed on the biomaterial surface, and next, after the secretion of ECM elements, also into the ECM proteins [1].

Integrins are a family of heterodimeric surface receptors, exerting their function in both mechanical and signaling pathways. After ligand binding, integrins cluster and associate with cytoskeletal elements in a form of focal adhesion plaques. The structure of these proteins are supramolecular assemblies that provide anchorage forces and activate signaling cascades involved in cell cycle regulation and cell differentiation [2]. Osteoblasts express multiple integrins that bind to several matrix ligands. In particular, integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$ play a key role in osteoblasts function and activity [3,4]. Integrin $\alpha 2\beta 1$ binds to collagen type I and has been reported to regulate osteogenic differentiation [5]. On the other hand, integrin $\alpha 5\beta 1$ receptor has been demonstrated to be necessary for bone-like nodule formation *in vitro* when osteoprogenitor cells are grown on tissue culture polystyrene (TCPS) and other synthetic biomaterials [6]. Profound understanding of the interaction between cells and material surface is essential for the clinical success in regenerative medicine. *In vitro* studies indicate that cell adhesion to the surface is the crucial event involved in the phenotypic maturation of human osteoblasts. All types of bone cells expressed $\alpha 1$ and $\alpha 5$ subunits; however, only a subpopulation of osteoblastic cells expressed $\alpha 2$, αv , and $\alpha v\beta 3$ subunits [7]. According to the recent knowledge, osteoblasts expressed numerous integrin subunits, namely: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ and $\beta 5$ [8,9].

Due to increasing knowledge on the role of integrins in differentiation and maturation of human osteoblasts and their potential clinical applicability, the interactions between biomaterials and integrins have become of great interest in TE. It is known that $\alpha v\beta 3$ integrin is a central molecule for osteoclastic bone resorption [10]. On the other hand, the expression of the integrin $\beta 1$ subunit, which interacts with the $\alpha 2$ and $\alpha 5$, was increased in osteoblast-like MG63 cells cultured on titanium (Ti) compared to tissue culture on TCPS [11]. In addition, the properties of surface materials, such as topography, chemistry or surface energy play an essential role in osteogenic cells activity, adhesion and growth, mainly by affecting the localization and structure of the integrins [12-14].

In this report, we focused on the role of the αv integrin subunit in osteoblasts proliferation and function during differentiation of primary human bone derived cells (HBDCs). So far, the role of αv integrin subunit has been demonstrated in osteoclastogenesis, but not in osteoblasts [15]. Previously, immunolocalization studies revealed the presence of $\beta 3$ and αv in focal contact areas [16]. Similar experiments were performed on human osteoblasts cultured on alumina and TCPS surfaces.

Primary cell culture of human osteoblasts

HBDCs were isolated with informed consent from adult femoral bone fragments removed at orthopaedic surgery. Experiments were repeated with cells obtained from three independent patients (aged 50-68 years). The procedure of HBDCs isolation was based on the protocols described with modifications by Kudelska-Mazur et al. [17]. Small pieces of bone were treated with collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 24 h and put into the culture medium. Cells were cultured until confluence in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Life Technologies B. V. Breda, Netherlands) enriched with 10% of heat-inactivated fetal calf serum (FBS; Gibco), 50 µg/ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco) supplemented with 2% L-glutamine (Gibco) and 0.1 M L-ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich) - called culture medium - and incubated at 37°C in the atmosphere of 95% humidity and 5% CO₂. The cells of the first passage were used in all experiments. Cells were seeded onto 4-well dishes at a population density of 4x10⁴ cells per well on TCPS or alumina disks surface and cultured in medium supplemented with 10 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich) and 100 nM 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol (Sigma-Aldrich) (called differentiating medium).

Blocking of α v integrin subunit with an antibody

A monoclonal antibody against human α v integrin (clone P2W7, Sigma-Aldrich) was used for integrin blocking experiments. The antibody was added to the culture medium at concentrations of 0 (control culture without antibody), 1, 2.5 and 5 µg/ml, 24 h after seeding the human osteoblasts. Media were changed every five days. Antibody was always added on the same day when media were changed and was present in the cultures for the whole experiment period. In four time-points of the culture after addition of the antibody, i.e. 24 h, 7, 14, and 21 days, its effects on cell morphology, viability, and alkaline phosphatase activity were determined (both in cultures on TCPS and alumina). Morphology observations were performed using an inverted microscope equipped with phase contrast (for TCPS cultures) and fluorescent microscope (for alumina cultures fixed with 1% glutaraldehyde) connected to Nikon Digital Sight DS-U1 camera (Nikon Eclipse TE2000-u; Nikon, Japan). The experiments were repeated three times using cells obtained from different patients.

Biomaterial

The material used in experiments was pure (99.9%) alumina prepared by the Institute of Glass, Ceramics, Refractory and Construction Materials, Warsaw, Poland. Samples of the biomaterials had a form of disks, 15 mm in diameter and 2 mm of height and before the experiments the samples were sterilized with irradiation at a dose of 25 kGy. Alumina discs were placed at the bottom of each 4 wells in the culture plate. Next, the cells were seeded on the surface of biomaterials and on the bottom of the control wells on PS at a density of 4x10⁴ cells per well (1.9 cm²).

Determination of cell count

The population of viable cells was assessed in the XTT (Sigma-Aldrich) assay, while the total cell number was determined by counting in the hematological camera. The number of viable cells was assessed after 24h as well as after 7, 14, and 21 days of culture. XTT assay is based on the ability of mitochondrial dehydrogenase enzymes of living cells to convert the XTT substrate (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carboxyl]-2H-tetrazolium hydroxide) into a water-soluble formazan product.

The concentration of color product of the reaction is proportional to the activity of mitochondrial respiration and thus to the number of viable cells. It was measured using an ELISA microplate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH, Germany) at a wavelength of 450 nm. The number of cells was calculated using the calibration curve referring XTT assay results to cell count in Burkler camera using optical microscope (Nikon Eclipse TE2000-u) as a direct method of cell number determination. The charts present the results of one representative experiment performed in three independent repeats.

Osteoblasts differentiation marker analysis

After determining cell viability, the cultures were rinsed three times with PBS (Gibco) and lysed with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) overnight (ON) at 4°C. Cellular alkaline phosphatase (ALP; Sigma-Aldrich) activity was measured using a colorimetric method based on the hydrolysis of p-nitrophenol phosphatase to p-nitrophenol. Absorbance of the reaction product was read at 405 nm using the FLUOstar OPTIMA reader (BMG LABTECH GmbH). ALP activity was calculated from the calibration curve according to the manufacturer's protocol (Alkaline Phosphatase Diagnostic Kit, Sigma-Aldrich). The enzyme activity was expressed in Sigma units /cell number. Experiments were repeated three times and the results of one representative study are presented.

Immunofluorescence localization of α v integrin subunit

HBDCs were seeded at cell density of 2x10⁴ cells per coverslide in cell culture medium. On the next day culture medium was exchanged for differentiating medium. At days 7, 14, and 21, HBDCs cells were washed in PBS and fixed with 3% formaldehyde in PBS (Gibco). Then, the cells were permeabilized in 0.1% Triton X-100 in PBS, washed three times in PBS and next incubated in 0.25% glycine in PBS for 30 minutes at room temperature. Non-specific binding was blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min, before incubation with the primary antibody. The cells were incubated overnight, at 4°C with the mouse monoclonal anti- α v specific integrin (Sigma-Aldrich) antibody, diluted 1:100 in 3% BSA/PBS. Then, the cells were washed in PBS and incubated with biotin-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) (dilution 1:100 in 3% BSA/PBS), followed with Extravidin-TRITC (Sigma-Aldrich) (dilution 1:100 in 3% BSA/PBS). As a control, non-labeled cells and cells labeled with a secondary antibody (biotin-conjugated) only as well as with Extravidin-TRITC only were observed. After a final washing in PBS, specimens were mounted in Ultra Cruz Mounting Medium containing DAPI (Santa Cruz Biotechnology). The images of stained cells were captured using fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE2000-u) equipped with Nikon Digital Sight DS-U1 camera.

Determination of mRNA level by semi-quantitative (sq) RT-PCR assay

Total RNA was isolated from cells harvested at different stages of differentiation using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics U.S. Headquarters, Indianapolis, USA). Specific transcripts were amplified by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (sqRT-PCR) with 1 µg total RNA as the template and specific oligonucleotide primers, using a Titan One-Tube RT-PCR Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Sequences of primers (synthesized by Singen Biotech, Poland) for the tested genes are shown in TABLE 1.

TABLE 1. The sequences of forward and reverse primers of osteocalcin (OC) α v integrin subunit and GAPDH.

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR product size (bp)
OC (BGLAP)	5'-ACTCCTCGCCCTATTGGC3-'	5'-AGAGCGACACCCTAGACCG3-'	300
α v integrin subunit (ITGAV)	5'-CTGATGCAGTGTGAGGAATTG3-'	5'-GCTAAGAGTTGAGTTCCAGCCT3-'	491
GAPDH	5'-TCAAGGAAGCTACGGGCA3-'	5'-TGGCAGAAATTACACACACAC-3'	250

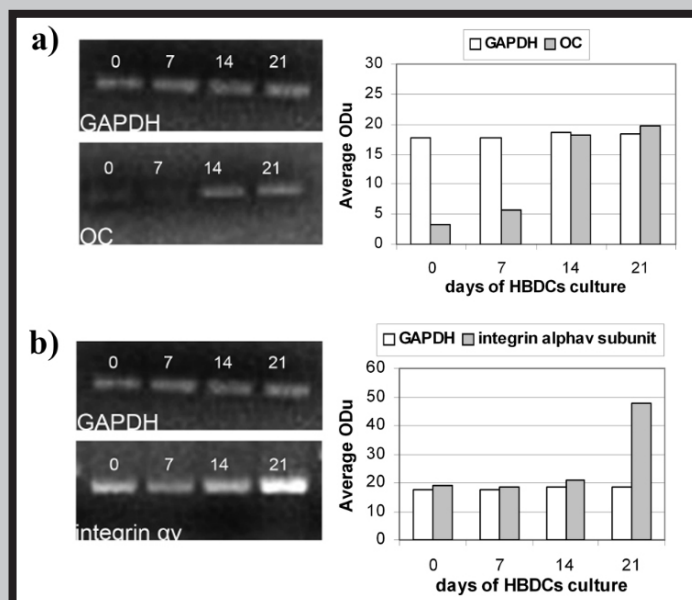


FIG. 1. Osteocalcin (OC) and integrin α v subunit expression. Changes in the level of osteocalcin (OC) and integrin α v subunit expression were examined during differentiation of HBDCs cultured on PS. RT-PCR products of OC and integrin α v subunit amplified from total mRNA of human osteoblasts cultured without differentiation medium (point 0 on the graph) and during differentiation of HBDCs *in vitro* (days 7, 14, 21) with the differentiation medium. The analysis of representative gels, and average optical density of bands (ODu) for OC (a) and integrin α v (b) are presented in the charts. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as a reference gene.

The obtained cDNA fragments were separated on 2% Agarose LE gels (Roche Diagnostics). The gels were stained with ethidium bromide and the optical density of bands was analyzed with Gel Doc 2000 using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). To evaluate the expression levels of transcripts in a semi-quantitative manner, the optical densities (ODu) of amplified cDNA fragments bands were compared with that of the constitutively expressed GAPDH. The results of one representative out of three independent sqRT-PCR experiments performed are presented.

Results

Determination of osteoblastic phenotype of HBDCs

To determine the ability of HBDCs to differentiate in primary culture, we examined changes in expression of specific osteoblastic gene marker – osteocalcin by sqRT-PCR (FIG. 1a). OC mRNA was present at a very low level at point 0 and day 7 in human derived cells. During differentiation of HBDCs, the level of OC mRNA increased from day 14 (18.2 ODu) and reached the highest concentration at day 21 (19.6 ODu). The mRNA expression of GAPDH, serving as a reference gene, presented the same level in each time-point.

Expression of α v integrin subunit

As α v integrin subunit might have a considerable influence on differentiation, we determined its mRNA concentration in HBDCs by sqPCR (FIG. 1b). Concentration of mRNA of α v integrin was similar in the HBDCs during the first 2 weeks of the culture in differentiating medium reaching 19.1 ODu at day 0, 18.72 ODu at day 7 and 21.08 ODu at day 14. The highest increase (47.8 ODu) of α v integrin mRNA was observed at day 21, when the HBDCs were finally matured. The mRNA expression of GAPDH serving as control presented the same level in each time-point (FIG. 1a, b).

The integrin α v immunolocalization in HBDCs

We used a specific antibody against the α v integrin subunit for its localization on the surface of HBDCs cultured 7 (FIG. 2a), 14 (FIG. 2b) and 21 (FIG. 2c) days. Immunostaining followed by fluorescence microscopy analysis indicated that HBDCs expressed α v integrin subunits at the focal adhesion sites (toe-like structures; FIG. 2, arrows).

HBDCs morphology analysis after IgG block

To determine the role of α v integrin in adhesion related signals for HBDCs differentiation we blocked its extracellular domain with specific antibody. Cells morphology was observed after 24 h and on day 7, 14 and 21. Representative microphotographs obtained after 24 h and 21 days after treatment with anti- α v IgG are shown in FIG. 3. 24 h after addition of anti- α v IgG, in concentrations 1, 2.5, 5 μ g/ml (FIG. 3b, c and d), there were no visible changes in morphology of treated with α v integrin specific IgG cells compared to control cultures (FIG. 3a). Human osteoblasts described as elongated spindle-shaped forms showed regular morphology. After 21 days of culture, the density of cells both maintained in absence and presence of anti- α v integrin IgG increased. We found that the morphology of HBDCs cultured with 1 μ g/ml of anti- α v IgG (FIG. 3f) was similar to the control (FIG. 3e), but higher concentrations of IgG influenced HBDCs behavior. Cultures containing 2.5 μ g/ml (FIG. 3g) and 5 μ g/ml (FIG. 3h) of anti- α v antibody had reduced density of adherent cells and presented changes in their appearance. As shown in FIG. 3g and 3h, less well-spread and less spindle-shaped cells were observed.

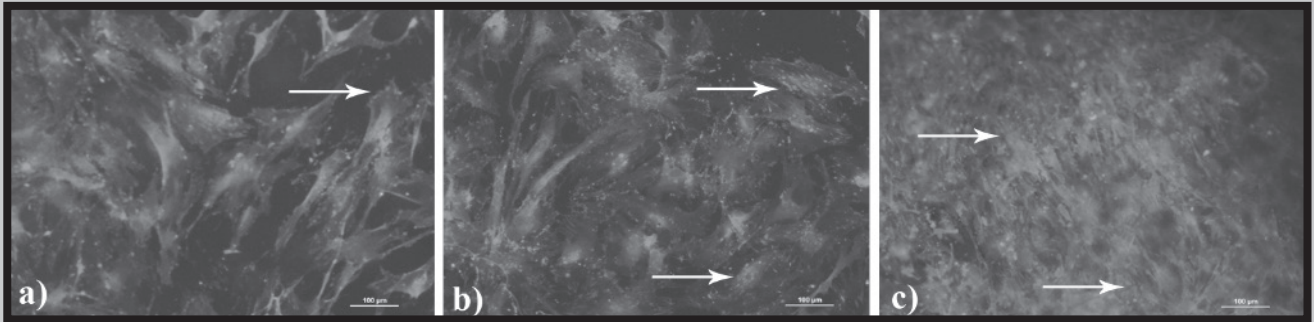


FIG. 2. Integrin subunits localization. The localization of αv integrin subunit in HBDCs was examined by immunostaining. Human osteoblasts cultured on coverslips were fixed at 7 (a), 14 (b) and 21 (c) days, stained with antibodies against αv subunit followed by secondary biotin conjugated antibodies, and next with Extravidin-TRITC. Fluorescence was detected using fluorescent microscope (Nikon Eclipse TE2000-u) equipped with Nikon Digital Sight DS-U1 camera. A monoclonal antibody against human αv integrin recognizes the extracellular domain of the αv subunit and representative images are presented. Arrows in the images indicate the integrin αv subunits at focal adhesion sites localization. Scale bar, 100 μm .

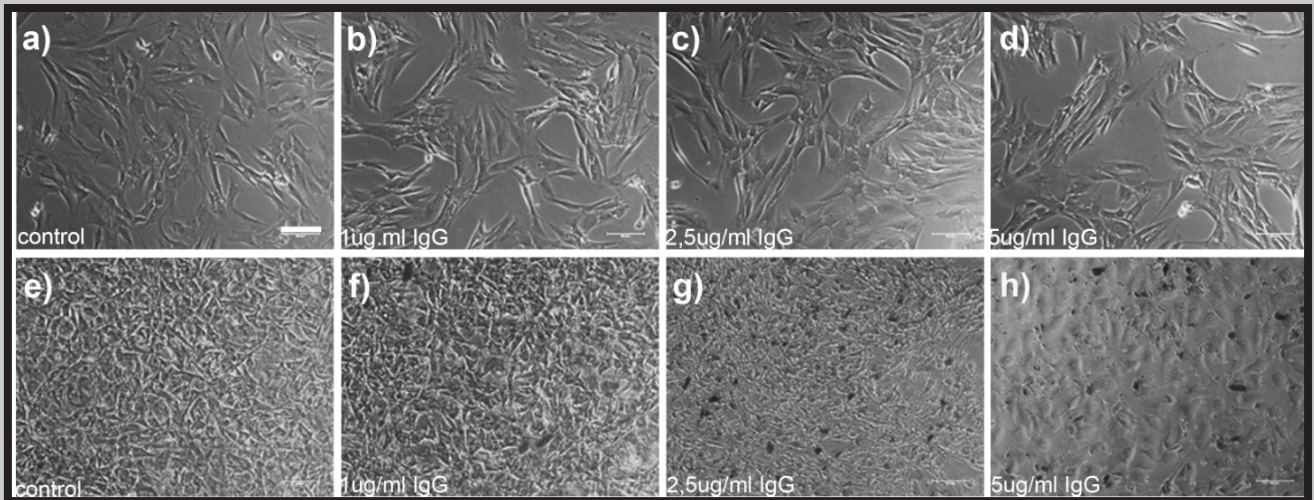


FIG. 3. Influence of integrin αv subunit inhibition on cell morphology. To compare the changes in human osteoblasts morphology during *in vitro* differentiation on TCPS, in the presence of antibodies (IgG) against the integrin αv subunit, cell cultures were analyzed using phase contrast microscope. Cultures of HBDCs were observed at every stage of their differentiation (24 h, 7, 14 and 21 days). Images from 24 h (b, c, d,) or 21 days of the culture (f, g, h) after treatment with three different concentrations of antibodies against αv integrin subunit are shown. Control samples cultured without antibodies are presented: a, e. Phase contrast micrographs. Scale bar, 100 μm .

Viability assay and effect of anti- αv antibody on HBDCs proliferation

Viability of HBDCs cultured in the absence or presence of different concentrations of αv integrin subunit specific antibody, in two different culture conditions – on TCPS or alumina surface was determined by XTT assay. The XTT assays results are presented in FIG. 4 (a – for TCPS, b – for alumina) as values of the absorbance read in an ELISA reader. The number of vital HBDCs in TCPS or alumina was determined from a calibration curve based on the absorbency of the formazan produced from HTT in the mitochondria of the living cells. Proliferation of HBDCs was inhibited in the presence of 1, 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti- αv IgG in cells cultured on TCPS, in comparison to control cultures (FIG. 4a). In contrast, the viability of cells cultured on alumina at different concentrations of anti- αv antibody and without specific IgG were similar (FIG. 4b). On day 14 of the culture, osteoblasts cell number on material surface suddenly dropped and bounced back at day 21 probably due to the large number of cells.

ALP activity effect of blocking αv integrin subunit

To identify the influence of αv integrin subunit IgG blockade on HBDCs differentiation we assessed ALP activity of cells maintained in different concentration of αv integrin specific IgG and on the studied surfaces. ALP assay was normalized to the number of viable cells determined with XTT assay. Mean values of alkaline phosphatase activity per cell are shown in FIG. 5. The experiments revealed considerable differences between surfaces, including TCPS (FIG. 5a) and alumina (FIG. 5b) showing that αv integrin blockade resulted in a decrease of the average ALP values for both cultures with more pronounced effect in cells cultured on alumina (FIG. 5b). At 1, 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti- αv IgG, after 21 days in differentiation medium HBDCs exhibited nearly 1 U/10⁴ cells of ALP activity whereas in control cultures the respective value was 1.5 U/10⁴ cells, as shown in FIG. 5b. In the HBDCs cultured on TCPS, the level of ALP activity in the presence of various concentrations of the anti- αv IgG was less pronounced in comparison to control culture; however, end-point results (after 21 days of culture) showed similar relation of αv integrin specific IgG concentration to ALP activity (FIG. 5a). On both surfaces αv integrin blockade specifically reduced ALP activity of differentiating HBDCs cultures.

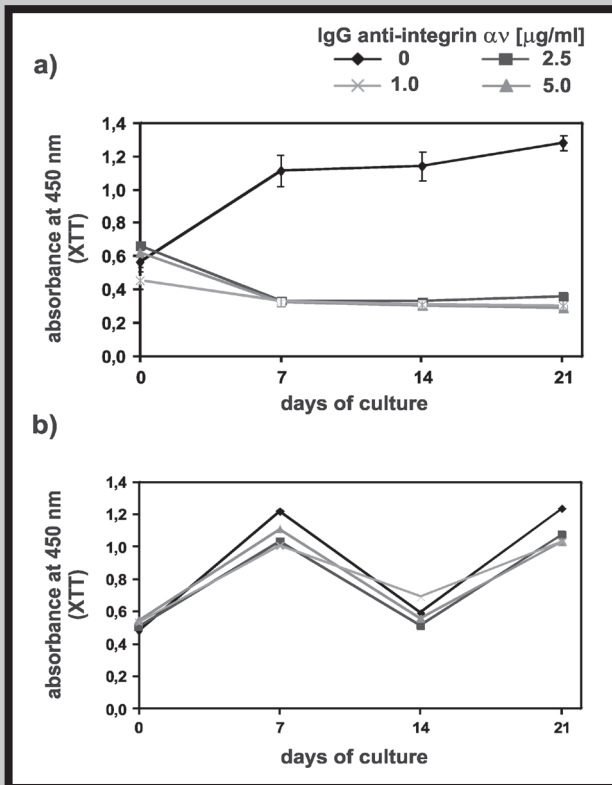


FIG. 4. Influence of integrin αv subunit inhibition on cell viability. The effect of anti- αv antibodies on the proliferation of HBDCs was examined by XTT assay. The results of XTT viability assay were determined in primary cultures of HBDCs on TCPS (a) or alumina (b) untreated of anti- αv antibody and treated with various concentrations of antibodies against αv integrin subunit (1, 2.5 or 5 $\mu\text{g/ml}$). Untreated cultures served as a control (0 $\mu\text{g/ml}$). The diagrams show the representative values from three independent experiments.

Discussion

This study is the first step to understand the role of αv integrin in the process of osteogenesis in osteoblast-like HBDCs, cultured on tissue culture polystyrene dishes and on clinically used orthopaedic implant material – alumina. We used two different surfaces: alumina and TCPS to compare the behavior of cells on two different substrates in a shoulder signal of integrin αv . Because of its excellent biocompatibility and good mechanical properties alumina ceramic material is used clinically in artificial joints and as a filler for various bone defects [18]. We hypothesized that blocking of the integrin αv subunit will exert an impact on the processes of proliferation and cells differentiation *in vitro*. Our results indicate that osteoblastic differentiation depends on αv integrin signaling and mediates some, but not all, effects of cell proliferation or maturation of osteogenic phenotype. We focused on the interaction between integrin signaling and morphology, growth, adhesion, and differentiation process of HBDCs.

Cell adhesion is a fundamental cellular process directly influencing cell migration as well as tissue morphogenesis, integrity, and repair [19]. Integrin family is the largest group of cell adhesion molecules. It consists of major cell surface receptors for ECM proteins. Furthermore, integrins conduct signals from ECM to the cell and from the cell to ECM, influencing cellular behavior [20]. Human osteoblasts express variety of integrins including $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 2\beta 1$.

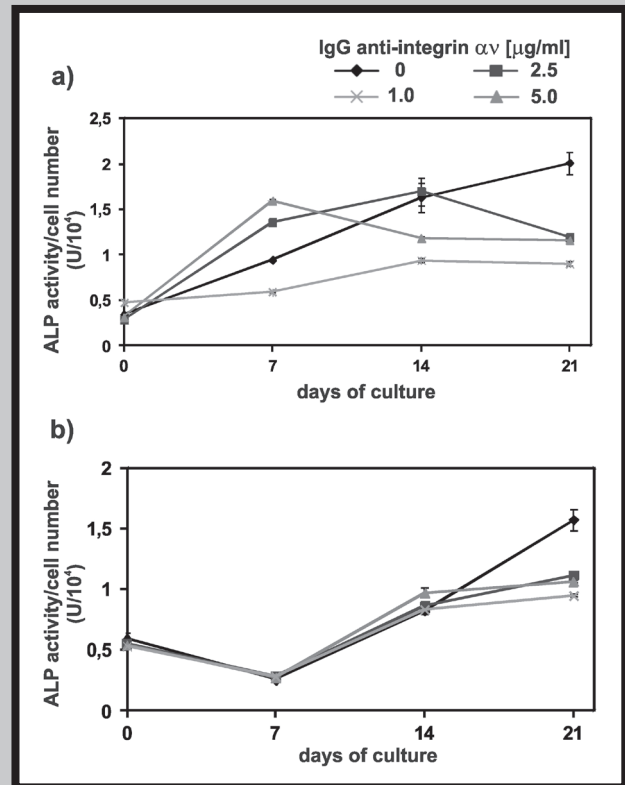


FIG. 5. Influence of integrin αv subunit inhibition on ALP activity. The effect of treatment of differentiating HBDCs with anti-integrin antibodies on the ALP activity was examined using colorimetric method. Primary human osteoblasts were cultured *in vitro* on TCPS (a) or alumina (b) without IgG (control) and in the presence of 1, 2.5 or 5 $\mu\text{g/ml}$ of antibodies against the extracellular domain of αv integrin subunit. The antibody was added 24 h after cells seeding, and one week later, when the differentiation medium has been changed. The number of cells was calculated from the calibration curve for the XTT assay. ALP activity was counted in Sigma units and normalized to number of cells divided (number of cells $\times 10^4$). The measurements were taken in four points of culture: 24 h, 7, 14 and 21 days after the addition of antibodies against αv integrin subunit, cell viability (XTT assay) and alkaline phosphatase activity tests have been determined. The diagrams show the mean values from three independent experiments.

Several studies have shown that integrins localize at the focal adhesion sites in many types of cell lines [21], but there were also reports indicating that some integrins were distributed on the cell membrane in dispersed manner [22]. The αv integrin subunits co-localized with $\beta 1$ integrin subunits at the focal adhesion plaques in human osteoblasts (HOBs) [23]. The results obtained in this study, using sqRT-PCR technique confirmed the expression of αv integrin subunit in human osteoblast-like HBDCs. The mRNA expression of αv integrin subunit raised during differentiation and reached the highest level at day 21. We considered 21st day as the final step of the HBDC differentiation as it was the moment when osteocalcin concentration was the highest and later on it did not increase. The fact that integrin αv subunit increases during maturation suggests that it might play an important role in this process.

To stimulate the differentiation and maturation process of HBDCs *in vitro* we incubated HBDCs in the presence of standard differentiating medium (0.1M L-ascorbic acid-2-phosphate containing culture medium enriched with 10 nM dexamethasone and 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol). Ascorbic acid-2-phosphate is essential for maturation of osteoblast-produced ECM protein, collagen type I [24]. 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol stimulates gene expression of bone-related transcription factors, i.e., Runx2, Osterix and osteoblasts differentiation markers such as: ALP or osteocalcin. Alkaline phosphatase is an early marker of osteoblasts differentiation, which increases prior to calcium phosphate deposition and decreases after the onset of mineralization. On the other hand, osteocalcin is a late marker, increasing with calcification of the extracellular matrix [25]. Primary HBDCs are the population of cells, which demonstrate distinct level of cell maturation. Therefore during their differentiation we checked mRNA level of OC. Our results show that the highest level of osteocalcin mRNA is expressed in HBDCs after 14 and 21 days of culture. This indicates that HBDCs acquired a mature osteogenic phenotype.

To determine the specific roles of integrin in the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts, many investigators have relied on the use of antibodies to block different integrin subunits. Thus, we decided to examine effects of blocking integrin α v subunits with specific monoclonal antibodies on cellular behavior of primary human osteoblast-like cells cultured on TCPS or alumina surface. Our results indicate that α v integrin affects osteoblasts differentiation through changes in induction of osteoblasts marker (ALP) and changes in cell proliferation and cell morphology. Treatment of HBDCs with monoclonal anti- α v antibody caused dose-dependent decrease in cell number and ALP activity in both TCPS and alumina surfaces. In our study, antibodies were added 24 h after seeding the cells when adherent HBDCs were observed in culture. Blocking antibodies were used at three different concentrations (1, 2.5, 5 μ g/ml) in culture medium during 21 days of HBDCs culture *in vitro*. With the time of culture morphology of antibody treated cells was steadily changing when compared to control cells. Characteristic elongated spindle-shaped form and regular morphology of HBDCs after 24 h of incubation with the antibody were observed for control cells as well as for cells treated with all used concentrations of α v integrin subunit specific antibody. Whereas, after 21 days of culture, the samples exposed to 2.5 μ g/ml and 5 μ g/ml of anti- α v antibody demonstrated reduced density of adherent cells and changes in their appearance. On the other hand, the samples cultured in the presence of 1 μ g/ml of α v integrin subunit specific antibody presented morphology and density similar to the control. Probably this concentration is insufficient to block all α v integrin subunits expressed on cell surface. As integrin expression and osteoblasts biology are closely related, the function of these molecules in early phases of the adhesion could represent an indicator of effectiveness of biomimetic surfaces in promoting adhesion, proliferation and function of osteoblasts [26]. Cells response to various concentrations of anti- α v antibody, suggests that α v integrin specific monoclonal antibodies used in the experiment probably block ligand binding sites of integrin subunit. Results of Wang et al. indicate that the antibody approach enables the blockade of β 1 signaling by integrins that are exposed on the cell surface rather than at the interface between cell and its substrates [27].

Osteoblasts interact with surface of TCPS and other biomaterials [28,29] through integrins in a similar manner to the natural interactions between bone matrix environment. What is more, osteoblasts as well as osteoblast-like cells produce components of ECM *in vitro* depositing them on the surface of culture material. These components are

responsible for cell adhesion to culture material in long-lasting cultures [30]. α 2 β 1 integrin binds to collagen type I, which is the major bone matrix protein [31]. Signaling of integrin α 2 β 1 has been reported to regulate osteoblastic differentiation [5] and blocking of integrin β 1 with a specific antibody resulted in decreased adhesion strength [1]. Many researchers claim that integrin β 1 is the major subunit in osteoblasts [27,32,33]. However, increasing integrin β 1 and β 3 mRNA levels, that are responsible for signal transduction necessary for osteogenic differentiation, was decreased or at least delayed [34]. Another integrin α 5 β 1 binding to fibronectin has been shown to be necessary for bone-like nodule formation *in vitro* when osteoblastic cells are maintained in tissue culture on PS [6]. As differences in HBDCs morphology and density can be observed after 21 days of treatment with α v integrin subunit specific antibody only, it seems that α v integrin subunit takes part in the interaction with ECM elements deposited on surfaces of TCPS or alumina rather than directly with the surface. This may also partly explain its increasing concentration and define the role of increasing amount of extracellular proteins produced by cells and adhered to the surface.

We used two different surfaces to determine whether the type of surface plays a role in the observed effects. Both materials are very well tolerated by cells. Tissue culture polystyrene is a standard material for *in vitro* culture and alumina is widely used in regenerative medicine [35,36]. However, cell behavior in both materials slightly differed. HBDCs cultured on TCPS were more susceptible to α v integrin subunit blockade and hence 3-fold reduction of proliferation was observed as early as after 7 days of treatment with specific antibody in all three studied concentrations. In contrast, blockade of α v integrin subunit with specific antibody did not influence the proliferation of cells cultured on alumina. The possible explanation of this phenomenon is different susceptibility of these materials to adherence of ECM proteins produced by cells.

The chemical composition and surface topography influences on the interaction between integrins, substrate, and cellular behavior. Cells on smooth surfaces tend to have a better-organized ECM and different organization of cytoskeleton. Osteoblastic cells have been shown to adhere to a wide variety of matrix proteins when coated on polystyrene dishes. Dedhar et al. demonstrated that up-regulation of fibronectin receptor in osteosarcoma cells correlated with phenotype and adhesion [37]. Although these studies have provided a great deal of evidence for mechanism involved in cellular attachment to tissue culture polystyrene, they do not necessarily correlate with attachment on implant materials. Other studies have shown altered profiles of integrin expression when primary osteoblasts are cultured on orthopaedic metals, as a function of both composition and topography [38].

We conclude that osteoblasts have differing abilities to use integrin-mediated mechanism for attachment on polystyrene and alumina, possibly by depositing different ECM proteins and changed the composition of integrin expression. It is possible that differences in composition of polystyrene and alumina result in the interaction of integrin with ECM proteins, affecting in different signaling pathways after blocking of integrin α v subunits. When the function of α v integrins was inhibited, the cells reduced capacity to differentiate which manifested with lower increase of ALP activity in the HBDCs on both materials. Thus, we conclude that integrin α v subunit seems to influence differentiation or maturation of osteoblastic phenotype in primary HBDCs *in vitro*. In our work we also observed that ALP activity in HBDCs treated with specific anti- α v antibody was lower on alumina than TCPS. Our results demonstrate that the specific effects of the α v integrin subunit blockade are time-dependent and slightly differ according to the type of biomaterial used.

Conclusions

In summary, we reported that blocking of integrin α v subunit with antibody influences proliferation and ALP expression in both alumina and TCPS cultures. Our data suggest involvement of the α v subunit in signal transduction in cellular behavior and maturation of HBDCs. Therefore, the investigation of molecular mechanism of integrin signaling governing human osteoblasts differentiation is very important for understanding the pathogenesis of human bone disease and our knowledge on cell activity after bone repairing interventions. Nevertheless, more intense studies of the interactions with other adhesion molecules are still needed to elucidate the role of integrin α v in behavior of human osteoblasts.

References

- [1] Athanassiou G., Deligianni D.: Adhesion strength of individual human bone marrow cells to fibronectin. Integrin beta1-mediated adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 12 (2001) 965-970.
- [2] Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K.M.: Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 793-805.
- [3] Clover J., Dodds R.A., Gowen M.: Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J Cell Sci* 103 (1992) 267-271.
- [4] Hughes D.E., Salter D.M., Dedhar S., Simpson R.: Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 8 (1993) 527-533.
- [5] Xiao G., Wang D., Benson M.D., Karsenty G., Franceschi R.T.: Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 273 (1998) 32988-32994.
- [6] Dedhar S.: Signal transduction via the beta 1 integrins is a required intermediate in interleukin-1 beta induction of alkaline phosphatase activity in human osteosarcoma cells. *Exp Cell Res* 183 (1989) 207-214.
- [7] Anselme K.: Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21 (2000) 667-681.
- [8] Cowles E.A., Brailey L.L., Gronowicz G.A.: Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 52 (2000) 725-737.
- [9] Bennett J.H., Carter D.H., Alavi A.L., Beresford J.N., Walsh S.: Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol* 46 (2001) 229-238.
- [10] Nakamura I., Duong Le T., Rodan S.B., Rodan G.A.: Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab* 25 (2007) 337-344.
- [11] Raz P., Lohmann C.H., Turner J., Wang L., Poythress N., Blanchard C., *et al*: 1alpha,25(OH)2D3 regulation of integrin expression is substrate dependent. *J Biomed Mater Res A* 71 (2004) 217-225.
- [12] Lee M.H., Ducheyne P., Lynch L., Boettiger D., Composto R.J.: Effect of biomaterial surface properties on fibronectin-alpha5beta1 integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials* 27 (2006) 1907-1916.
- [13] Wan Y., Wang Y., Liu Z., Qu X., Han B., *et al*: Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide). *Biomaterials* 26 (2005) 4453-4459.
- [14] Zhang X., Hu J., Li Y., Yin G., Luo E.: Effects of ibandronate-hydroxyapatite on resorptive activity of osteoclasts. *Arch Med Sci* 7 (2011) 53-60.
- [15] Chin S.L., Johnson S.A., Quinn J., Miroslavljivic D., Price J.T., Dudley A.C., Thomas D.M.: A role for alphaV integrin subunit in TGF-beta-stimulated osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 307 (2003) 1051-1058.
- [16] Pistone M., Sanguineti C., Federici A., Sanguineti F., Defilippi P., Santolini F., Querze G., *et al*: Integrin synthesis and utilization in cultured human osteoblasts. *Cell Biol Int* 20 (1996) 471-479.
- [17] Kudelska-Mazur D., Lewandowska-Szumiel M., Mazur M., Komender J.: Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression. *Cell Tissue Bank* 6 (2005) 55-64.
- [18] Tohma Y., Tanaka Y., Ohgushi H., Kawate K., Taniguchi A., Hayashi K., Isomoto S., Takakura Y.: Early bone in-growth ability of alumina ceramic implants loaded with tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 24 (2006) 595-603.
- [19] Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C.: Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 4 (1988) 487-525.
- [20] Schneider G.B., Whitson S.W., Cooper L.F.: Restricted and coordinated expression of beta3-integrin and bone sialoprotein during cultured osteoblast differentiation. *Bone* 24 (1999) 321-327.

Acknowledgments

This work was supported by a grant (No. 3 T08A 001 30 for Edyta Wróbel) from Polish Ministry of Science and Higher Education. Biomaterials (pure alumina disc-shaped samples) were prepared by the Institute of Glass, Ceramics, Refractory and Construction Materials, 9 Postępu St., 02-676 Warszawa, Poland. Special thanks to Agnieszka Mikulska for preparing the primary cell cultures and Professor Małgorzata Lewandowska-Szumiel for valuable discussions and support.

- [21] Delannet M., Martin F., Bossy B., Cheresch D.A., Reichardt L.F., Duband J.L.: Specific roles of the alpha V beta 1, alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin. *Development* 120 (1994) 2687-2702.
- [22] Wayner E.A., Orlando R.A., *et al*: Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol* 113 (1991) 919-929.
- [23] Lai C.F., Cheng S.L.: Alphavbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 20 (2005) 330-340.
- [24] Maehata Y., Takamizawa S., Ozawa S., Kato Y., Sato S., Kubota E., Hata R.: Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol* 25 (2006) 47-58.
- [25] Calvo M.S., Eyre D.R., Gundberg C.M.: Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev* 17 (1996) 333-368.
- [26] Amato I., Ciapetti G., Pagani S., Marletta G., Satriano C., Baldini N., Granchi D.: Expression of cell adhesion receptors in human osteoblasts cultured on biofunctionalized poly-(epsilon-caprolactone) surfaces. *Biomaterials* 28 (2007) 3668-3678.
- [27] Wang L., Zhao G., Olivares-Navarrete R., Bell B.F., Wieland M., Cochran D.L., Schwartz Z., Boyan B.D.: Integrin beta1 silencing in osteoblasts alters substrate-dependent responses to 1,25-dihydroxy vitamin D3. *Biomaterials* 27 (2006) 3716-3725.
- [28] Lewandowska-Szumiel M., Sikorski K., Szummer A., Komender J., *et al*: Experimental model for observation of micromotion in cell culture. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 72 (2005) 379-387.
- [29] Lewandowska-Szumiel M., Sikorski K., Szummer A., Lewandowski Z., Marczyński W.: Osteoblast response to the elastic strain of metallic support. *J Biomech* 40 (2007) 554-560.
- [30] Walboomers X.F., Jansen J.A.: Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology* 89 (2001) 2-11.
- [31] Takeuchi Y., Suzawa M., Kikuchi T., Nishida E., Fujita T., Matsumoto T.: Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 29309-29316.
- [32] Hirai F., Nakayama S., Okada Y., Saito K., Kurose H., Mogami A., Tanaka Y.: Small GTPase Rho signaling is involved in beta1 integrin-mediated up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on osteoblasts and osteoclast maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 356 (2007) 279-285.
- [33] Gronowicz G.A., McCarthy M.B.: Glucocorticoids inhibit the attachment of osteoblasts to bone extracellular matrix proteins and decrease beta 1-integrin levels. *Endocrinology* 136 (1995) 598-608.
- [34] Siebers M.C., Walboomers X.F., Van Den Dolder J., Leeuwenburgh S.C., Wolke J.G., Jansen J.A.: The behavior of osteoblast-like cells on various substrates with functional blocking of integrin-beta1 and integrin-beta3. *J Mater Sci Mater Med* 19 (2008) 861-868.
- [35] Bertazzo S., Zambuzzi W.F., Da Silva H.A., Ferreira C.V., Bertran C.A.: Bioactivation of alumina by surface modification: a possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. *Clin Oral Implants Res* 20 (2009) 288-293.
- [36] Kim Y.H., Anirban J.M., Song H.Y., Seo H.S., Lee B.T.: In vitro and in vivo evaluations of 3D porous TCP-coated and non-coated alumina scaffolds. *J Biomater Appl* 25 (2011) 539-558.
- [37] Dedhar S., Argraves W.S., Suzuki S., Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.: Human osteosarcoma cells resistant to detachment by an Arg-Gly-Asp-containing peptide overproduce the fibronectin receptor. *J Cell Biol* 105 (1987) 1175-82.
- [38] Sinha R.K., Tuan R.S.: Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* 18 (1996) 451-7.



STUDIA PODYPLOMOWE

Biomateriały – Materiały dla Medycyny

2015/2016

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 210 tel. 12 617 44 48, 12 617 47 44, fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła Sekretarz: Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz	http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/ studia-podyplomowe/biomateriały-materiały-dla-medycyny/
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2015 do 20.10.2015 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 47 44, e-mail: krok@agh.edu.pl)	
Czas trwania: 2 semestry (160 h) 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu Przewidywana data rozpoczęcia: 28.11.2015	Opłaty: 2 600 zł

SPROSTOWANIE / CORRIGENDUM

Dotyczy artykułu / for the paper:

K. Pietryga, J. Costa, P. Pereira, T.E.L. Douglas, E. Pamuła: Wspomaganie wzrostu komórek kostnych na hydrożelach z gumy gellan za pomocą mineralizacji enzymatycznej / Promotion of bone cells growth on Gellan Gum hydrogels by enzymatic mineralization. *Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów* 125 (2014) 6-12.

Powinno być / Should read:

**KRZYSZTOF PIETRZYGA¹, JOANA COSTA², PEDRO PEREIRA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{1*}**

**KRZYSZTOF PIETRZYGA¹, JOANA COSTA², PEDRO PEREIRA²,
TIMOTHY E.L. DOUGLAS³, ELŻBIETA PAMUŁA^{1*}**

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

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

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

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

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

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

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

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