ENGINEERING OF BIOMATERIALOW

Journal of Polish Society for Biomaterials and Faculty of Materials Science and Ceramics AGH-UST Czasopismo Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów i Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH

Number 130 Numer 130 Volume XVIII Rok XVIII

JANUARY 2015 STYCZEŃ 2015

ISSN 1429-7248

PUBLISHER: WYDAWCA:

Polish Society for Biomaterials in Krakow Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

EDITORIAL COMMITTEE: KOMITET REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief Redaktor naczelny Jan Chłopek

Editor Redaktor Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial Sekretarz redakcji Design Projekt Katarzyna Trała Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

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

Issue: 250 copies Nakład: 250 egz.

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



BI MATERIALS

EDITORIAL BOARD KOMITET REDAKCYJNY

EDITOR-IN-CHIEF Jan Chłopek - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

EDITOR Elżbieta Pamuła - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA LUCIE Bacakova - Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic Romuald Będziński - WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Stanisław Błażewicz - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA Jan Ryszard Dąbrowski - Białystok Technical University, Poland Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY Małgorzata Lewandowska-Szumieł - Medical University of Warsaw, Poland Jan Marciniak - Silesian University of Technology, Zabrze, Poland Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM Stanisław Mitura - Technical University of Lodz, Poland Roman Pampuch - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Abhay Pandit - National University of Ireland, Galway, Ireland Stanisław Pielka - WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM Jacek Składzień - Jagiellonian University, Collegium Medicum, Krakow, Poland Andrei V. Stanishevsky - University of Alabama at Birmingham, USA Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Tadeusz Trzaska - University School of Physical Education, Poznań, Poland Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

BI MATERIALS

Wskazówki dla autorów

.

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

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.

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

4. Struktura artykułu:

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

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

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

9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.

10. Adres redakcji:

Czasopismo

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

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

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41 Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN Konto: Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 ING Bank Śląski S.A. O/Kraków nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" should be written in English.

2. All articles are reviewed.

3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.

4. A manuscript should be organized in the following order:

• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words)

Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References

5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Highresolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

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

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

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

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

10. Address of editorial office:

Journal

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

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

Subscription terms

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

27th European Conference on Biomaterials

ESB2015

Π

30 August–3 September Kraków, Poland



BI MATERIALS

SPIS TREŚCI

BADANIA MATERIAŁOWE I KOROZYJNE KONWENCJONALNYCH STOPÓW CO-Cr-MO-W PRZEZNACZONYCH NA ODLEWY KONSTRUKCJI SZKIELETOWYCH W PROTETYCE DENTYSTYCZN JOANNA AUGUSTYN-PIENIĄŻEK, ALICJA ŁUKASZCZYK, JOANNA LOCH	iej 2
DEGRADACJA HYDROLITYCZNA RUSZTOWAŃ KOMÓRKOWYCH FORMOWANYCH Z TERPOLI- MERÓW; L-LAKTYDU, GLIKOLIDU I TMC, ORAZ L-LAKTYDU, GLIKOLIDU I E-KAPROLAKTONU Marta Kot, Lidia Wawryło, Piotr Rychter, Wojciech Prochwicz, Anna Smola, Piotr Dobrzyński	10
OSZACOWANIE STABILIZACJI ZŁAMANIA TRZON KOŚCI UDOWEJ PRZEZ PŁYTKĘ PRZYKOSTNĄ PRZY WYKORZYSTANIU METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH Marek S. Kozień, Jacek Lorkowski, Iwona Górka, Magdalena Kornaga, Oliwia Grzegorowska, Andrzej Kotela, Ireneusz Kotela	u 20

LIPOSOMY JAKO NOŚNIKI SUBSTANCJI AKTYWNYCH PRZENOSZONYCH W GŁĄB SKÓRY Urszula Goik, Izabela Załęska-Żyłka, Agata Pietrzycka 27

CONTENTS

MATERIAL AND CORROSION STUDIES OF CONVENTIONAL CO-Cr-MO-W ALLOYS FOR FRAME CONSTRUCTION CASTS IN DENTAL PROSTHETICS JOANNA AUGUSTYN-PIENIĄŻEK, ALICJA ŁUKASZCZYK, JOANNA LOCH

HYDROLYTIC DEGRADATION OF BIODEGRADABLE SCAFFOLDS BASED ON L-LACTIDE/GLYCOLIDE/ TMC AND L-LACTIDE/GLYCOLIDE/ε-CAPROLACTONE TERPOLYMERS MARTA KOT, LIDIA WAWRYŁO, PIOTR RYCHTER, WOJCIECH PROCHWICZ, ANNA SMOLA, PIOTR DOBRZYŃSKI 10

2

20

27

WOJCIECH PROCHWICZ, ANNA SMOLA, PIOTR DOBRZYŃSKI 10 ESTIMATION OF STABILIZATION OF FEMORAL

SHAFT FRACTURES BY PARAOSTEAL PLATE USING FINITE ELEMENT METHOD Marek S. Kozień, Jacek Lorkowski, Iwona Górka, Magdalena Kornaga, Oliwia Grzegorowska, Andrzej Kotela, Ireneusz Kotela

LIPOSOMES AS CARRIERS FOR THE DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES TO THE SKIN URSZULA GOIK, IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA, Agata Pietrzycka

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

.

BADANIA MATERIAŁOWE I KOROZYJNE KONWENCJONA-LNYCH STOPÓW Co-Cr-Mo-W PRZEZNACZONYCH NA ODLEWY KONSTRUKCJI SZKIELETOWYCH W PROTETYCE DENTYSTYCZNEJ

Joanna Augustyn-Pieniążek^{1*}, Alicja Łukaszczyk², Joanna Loch²

¹AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Metali i Informatyki Przemysłowej, Katedra Metaloznawstwa i Metalurgii Proszków, al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków ²AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Odlewnictwa, Katedra Chemii i Korozji Metali, ul. Reymonta 23, 30-059 Kraków * E-Mail: Jap@agh.edu.pl

Streszczenie

2

Podstawowe cechy jakimi powinny charakteryzować się materiały stosowane na protezy szkieletowe w stomatologii to biotolerancja w środowisku tkanek i płynów ustrojowych oraz duża odporność na korozję wżerową i szczelinową. Ważna jest również stabilność zespołu określonych własności fizyczno-mechanicznych (wysoka wytrzymałość, odpowiednia ciągliwość, twardość i odporność na ścieranie) oraz jednorodność składu chemicznego W pracy przedstawiono wyniki badań konwencjonalnych stopów odlewniczych Co-Cr-Mo-W stosowanych do wykonywania odlewów szkieletów protez ruchomych, koron i mostów w protetyce dentystycznej. Badania wykonano na czterech stopach Co-Cr-Mo-W o różnej zawartości Mo, W oraz innych domieszek. W pracy dokonano analizy mikrostruktury stopów z zastosowaniem mikroskopu świetlnego oraz elektronowego mikroskopu skaningowego. Dodatkowo wykonano pomiary mikrotwardości metodą Vickersa oraz badania odporności korozyjnej. Dla każdego z badanych stopów Co-Cr-Mo-W wykreślono zależność potencjału stacjonarnego w funkcji czasu oraz wykonano badania woltamperometryczne w środowisku sztucznej śliny. Przeprowadzone obserwacje metalograficzne pozwoliły stwierdzić, że analizowane materiały charakteryzowały się budową dendrytyczną typową dla stopów odlewanych. Mikrostruktura ta jest chemicznie niejednorodna, złożona z austenitycznej osnowy składającej się z roztworu stałego kobaltu oraz chromu w rdzeniowej strukturze dendrytycznej. Stopy charakteryzowały się wysoką twardością. Wzrost mikrotwardości jest silnie determinowany występowaniem wydzieleń węglikowych M23C6, które zapewniają dużo silniejsze umocnienie stopu. Analizowane stopy wykazywały zbliżone przebiegi krzywych polaryzacji. Zachowanie elektrochemiczne stopów Co-Cr-Mo-W w dużej mierze zależy od zawartości w stopie chromu i molibdenu, pierwiastków, które przyczyniają się do pasywacji stopów.

Słowa kluczowe: konwencjonalne stopy na osnowie kobaltu, protetyka dentystyczna, roztwór sztucznej śliny, odporność korozyjna, woltamperometria liniowa

[Inżynieria Biomateriałów 130 (2015) 2-9]

MATERIAL AND CORROSION STUDIES OF CONVENTIONAL Co-Cr-Mo-W ALLOYS FOR FRAME CONSTRUCTION CASTS IN DENTAL PROSTHETICS

Joanna Augustyn-Pieniążek^1*, Alicja Łukaszczyk², Joanna Loch²

 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 AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF FOUNDRY ENGINEERING, DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND CORROSION OF METALS REYMONTA 23 STREET, 30-059 KRAKOW, POLAND
 * E-MAIL: JAP@AGH.EDU.PL

Abstract

The basic characteristics of skeletal prosthetic materials used in dentistry are: biotolerance with tissues and body fluids, as well as high pitting and crevice corrosion resistance. Also important are such characteristics as: high strength, adequate ductility, hardness and abrasion resistance, as well as homogeneity of the chemical composition. The work presents the results of the studies of conventional Co-Cr-Mo-W casting alloys used in the production of frame casts of removable dentures, crowns and bridges in dental prosthetics. The studies were performed on four Co-Cr-Mo-W alloys of different contents of Mo, W and other additives. The work analyzes the alloys microstructures with the use of a light microscope and a scanning electron microscope. Additionally, hardness measurements were made by means of the Vickers method and corrosion resistance tests were conducted. For each examined Co-Cr-Mo-W alloy, the open circuit potential as a function of time was determined and voltamperometric tests were performed in artificial saliva. The microstructure of the examined alloys was of the dendrite type. This microstructure was chemically inhomogeneous and consisted of an austenitic matrix formed by a solid cobalt solution and chromium in the core dendritic structure. The investigated alloys were characterized by high hardness. The increase in the microhardness was depended on the presence of carbide precipitates M₂₃C₆, which provide a much stronger reinforcement of the alloy. The analyzed materials exhibited a similar progress of the polarization curves. The electrochemical corrosion of Co-Cr-Mo-W alloys was depended on the content of chromium and molybdenum, which largely contributed to alloy passivation.

Keywords: conventional cobalt-based alloys, dental prosthetics, artificial saliva solution, corrosion resistance, linear sweep voltammetry

[Engineering of Biomaterials 130 (2015) 2-9]

Wprowadzenie

Stopy kobaltu odporne na zużycie zwane są też powszechnie stellitami, zostały opracowane i opatentowane przez Elwooda Haynesa na początku XX w. W ostatnim ćwierćwieczu wraz z postępem biomedycyny i rozwojem techniki wzrosły wymagania stawiane tym stopom. Materiały te powinny charakteryzować się nie tylko biokompatybilnością [1] czy odpornością korozyjną [2-4], ale również dobrymi własnościami mechanicznymi i plastycznymi [5-9], ze względu na wciąż rosnące wymagania eksploatacyjne.

Omawiane w prezentowanej pracy stopy z grupy metali nieszlachetnych Co-Cr-Mo-W cechuje srebrzystobiała barwa, gęstość ich waha się w granicach 8,2-8,5 g/cm³. Są to stopy o dużej wytrzymałości mechanicznej, granica plastyczności ($R_{p0.2}$) wynosi 490-540 MPa, wytrzymałość na rozciąganie (R_m) waha się w granicach 680-790 MPa, zaś wydłużenie A_5 wynosi 5-14% [10-14].

Konwencjonalne stopy Co-Cr-Mo-W zawierają w swoim składzie chemicznym głównie 60% kobaltu, ok. 18-30% chromu, zmienną zawartość molibdenu (1-6%), wolframu (1-15%) i węgla (0,1-3,2%). W stanie lanym stopy Co-Cr-Mo-W posiadają strukturę dendrytyczną roztworu stałego chromu, molibdenu lub wolframu w kobalcie [6,7]. Stop umacniają dyspersyjnie wydzielenia twardych węglików o strukturze złożonej typu $M_{23}C_6$ [17-19].

Według Taylora i Waterhausa [20] powstają też pierwotne węgliki typu M_7C_3 , a według innych naukowców Clemowa i Daniella [21] również M_6C o twardości wynoszącej ok. 1600 HV. Obecność węglików w stopie jest jedną z przyczyn występowania w materiale korozji wżerowej i międzykrystalicznej. Twardość stopu zależy nie tylko od zawartości węgla, ale głównie od powstałych węglików, ich dyspersji, kształtu i rozmieszczenia w stopie. Chrom w stopach z kobaltem rozszerza pole roztworu β -Co, stosuje się go, by zapobiec dechromizacji osnowy w przypadku tworzenia się węglików.

Odpowiednio dobrana obróbka cieplna pozwala zmienić mikrostrukturę stopu Co-Cr. Po wyżarzaniu ujednorodniającym prowadzonym w zakresie 1220-1260°C struktura dendrytyczna zanika, a węgliki częściowo przechodzą do roztworu stałego kobaltu. Z kolei zbyt wysoka zawartość kobaltu w stopie uniemożliwia przeprowadzenie wyżarzania zmiękczającego, co w znacznym stopniu zmniejszyłoby twardość stopu, a tym samym ułatwiłoby to obróbkę mechaniczną gotowych, odlanych metalowych elementów protetycznych. Zgodnie z ostatnimi badaniami przeprowadzonymi w laboratoriach Cabot Corporation Technology zawartość kobaltu w stellitach może być z powodzeniem ograniczona do 30-35% bez pogorszenia ich własności eksploatacyjnych [22].

Twardość, sprężystość oraz dobra lejność sprawiają, że stopy Co-Cr przeznaczone są głównie do wykonywania odlewów szkieletów protez ruchomych [23,28]. Te o niższej twardości przeznacza się na odlewy koron i mostów. Ze względu na wysoką twardość stopy Co-Cr są trudno obrabialne, co w dalszej kolejności przekłada się na trudność przebiegu obróbki mechanicznej gotowych, odlanych elementów protetycznych. Szlifowanie gotowego elementu materiałami ściernymi, piaskowanie i polerowanie powierzchni do lustrzanego połysku jest determinowane własnościami mechanicznymi obrabianego stopu.

Sama technologia odlewania stopów Co-Cr jest trudna i wymaga precyzyjnego dotrzymania warunków technicznych. Stopy te są topione w atmosferze powietrza w zakresie od 1285°C do 1400°C [10-14].

Introduction

Cobalt alloys resistant to wear are commonly called stellites. They were elaborated by Elwood Haynes at the beginning of the 20th century. In the last 25 years, together with the biomedicine progress and the development of technology, the requirements made for these alloys have risen. These materials should be characterized not only in terms of biocompatibility [1] and corrosion resistance [2-4], but also in good mechanical and elastic properties [5-9], due to the constantly rising performance requirements.

The alloys discussed in this work, which belong to the group of non-precious Co-Cr-Mo-W metals, characterize in a silver-white colour and a density varying in the range of 8.2-8.5 g/cm³. They are alloys of high mechanical strength; their yield point ($R_{p0.2}$) equals 490-540 MPa, their tensile strength (R_m) varies within the range of 680-790 MPa, and their elongation A_5 equals 5-14% [10-14].

Conventional Co-Cr-Mo-W alloys contain mainly 60% of cobalt, about 18-30% of chromium, as well as a varying content of molybdenum (1-6%), tungsten (1-15%) and carbon (0.1-3.2%). In the state as-cast, Co-Cr-Mo-W alloys have a dendritic structure of a solid solution of chromium, molybdenum or tungsten in cobalt [15,16]. The alloy is reinforced with dispersive precipitates of carbides of a complex $M_{23}C_6$ type structure [17-19].

According to Taylor and Waterhaus [20], also formed are primary carbides of the M_7C_3 type, and according to other scientists, Clemow and Daniell [21], M_6C is formed as well, the hardness of which equals about 1600 HV. The presence of carbides in the alloy is one of the causes of the occurrence of pitting and intercrystalline corrosion in the material. The hardness of the alloy depends not only on the carbon content, but mainly on the formed carbides - their dispersion, shape and distribution in the alloy. Chromium in the alloys with cobalt expands the solution β -Co region, and it is used in order to prevent dechromization of the matrix in the case of carbide formation.

A properly selected thermal treatment allows for a change in the microstructure of the Co-Cr alloy. After a homogenizing treatment, performed in the temperature range of 1220-1260°C, the dendritic structure decays, and the carbides are partially transferred to the solid cobalt solution. Too high content of cobalt, in turn, makes it impossible to perform soft annealing, which would significantly lower the alloy's hardness and thus facilitate the thermal treatment of ready cast metal prosthetic elements. According to the recent studies conducted at the Cabot Corporation Technology laboratories, the cobalt content in stellites can be successfully limited to 30-35% without impairing their performance [22].

Their hardness, elasticity and good castability make the Co-Cr alloys good candidates mainly for the production of removable denture frame casts [23,28]. Those of a lower hardness are assigned for casting crowns and bridges. Due to their high hardness, Co-Cr alloys are hard to treat, which further translates to a difficult course of mechanical treatment of ready cast prosthetic elements. The grinding of a ready element with the use of abrasive materials, as well as the sand blasting and polishing of the surface to obtain bright polish, are determined by the mechanical properties of the treated alloy.

The casting technology itself, in the case of Co-Cr alloys, is difficult and requires precision in the fulfilment of the technological requirements. These alloys are melted in air atmosphere within the range of 1285°C to 1400°C [10-14].

Stopy Co-Cr-Mo-W charakteryzują się również bardzo wysoką odpornością na korozję, nawet w skrajnie agresywnych środowiskach korozyjnych. Taką cechę zawdzięczają wysokiej zawartości chromu. Odporność stellitów na korozję w środowisku jamy ustnej determinowana jest przez ich naturalną zdolność do tworzenia warstwy pasywnej na powierzchni stopu. W jej skład wchodzą głównie tlenki chromu i pierwiastków stopowych. Podsumowując, im bardziej stabilna, dobrze przylegająca warstwa pasywna pokrywająca stopy Co-Cr-Mo, tym lepsza ich odporność korozyjna, a także mniejsza ilość jonów metali uwalniających się do organizmu. Stopy implantowane korodują w środowiskach biologicznych, głównie z powodu zużywania się materiałów implantowanych w wyniku obluzowywania protez, zakażeń, korozji ciernej oraz zachodzenia procesów metabolicznych [24].

Celem pracy była charakterystyka mikrostruktury, własności mechanicznych oraz odporności na korozję konwencjonalnych stopów odlewniczych Co-Cr-Mo-W stosowanych jako materiały metalowe na elementy wykonywane w protetyce dentystycznej. W ramach badań wykonano obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i elektronowej mikroskopii skaningowej (SEM), pomiary mikrotwardości oraz badania odporności na korozję w roztworze sztucznej śliny.

Materiały i metody

Materiałem przeznaczonym do badań były cztery stopy odlewnicze: Co-Cr-Mo-W firm: Eisenbacher Dentalwaren ED GmbH (Robur 400), Bego Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. (Wirobond 280), Feguramed GmbH (Combibond BST Triumph), Heraeus (Heraenium PW). Składy chemiczne badanych stopów przedstawiono w TABELI 1.

Próbki do badań o wymiarach: $\emptyset = 8 \text{ mm}$, h = 15 mm poddano obróbce mechanicznej, która składała się z dwóch procesów, które następowały bezpośrednio po sobie: (1) szlifowanie mechaniczne na papierach ściernych (FEPA, o gradacji 120-1200), (2) polerowanie mechaniczne, które obejmowało końcowe etapy przygotowania próbki.

Do polerowania użyto pasty diamentowej o wstępnej gradacji 1 µm, natomiast końcowe polerowanie – o gradacji ¼ µm. Procesy szlifowania oraz polerowania zostały wykonane na maszynie polersko-szlifierskiej firmy Struers. W celu ujawnienia mikrostruktury badanych materiałów, próbki zostały poddane trawieniu chemicznemu, przy zastosowaniu następujących odczynników trawiących: 1 ml HNO₃ (stężenie kwasu 65%) + 3 ml HCI (stężenie kwasu 38%) oraz 3 ml HNO₃ (stężenie kwasu 65%) + 1 ml HF (stężenie kwasu 40%) + 1 ml gliceryny.

Próbki do badań obserwowano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego LEICA DM 4000. Dodatkowo próbki poddano obserwacji mikroskopowej przy zastosowaniu skaningowego mikroskopu elektronowego HITACHI S-3500N, wyposażonego w analizator EDS – firmy Noran.

Pomiary mikrotwardości przeprowadzono metodą Vickersa przy użyciu mikrotwardościomierza firmy Innovatest stosując obciążenie 0,9807 N. Na podstawie otrzymanych wyników pomiarów obliczono wartość średnią mikrotwardości (HV 0.1) oraz odchylenie standardowe.

Pomiary elektrochemiczne miały na celu ocenę odporności korozyjnej badanych stopów. Każdorazowo powierzchnia badanej próbki stopu wynosiła 50 mm². Próbki polerowano przy użyciu papierów ściernych z węglika krzemu (SiC) o ziarnistości do 4000. Badania elektrochemiczne zostały przeprowadzone w wodnym roztworze sztucznej śliny o pH = 6,8 ze swobodnym dostępem tlenu w temperaturze 37°C. Skład chemiczny roztworu sztucznej śliny podaje TABELA 2. Owing to the high content of chromium, Co-Cr-Mo-W alloys characterize in a very high corrosion resistance, even in extremely aggressive corrosive environments. Stellites' corrosion resistance in the environment of the oral cavity is determined by their natural ability to form a passive layer on the surface of the alloy, which contains mainly oxides of chromium and other alloying elements. Generally, the stronger and the more stable the passive oxide film on the Co–Cr–Mo implant alloy, the better the corrosion resistance and also the lesser the release of the metallic ions from the implant alloy. Evidently, it was found that the implanted alloy corroded in the biological solution due to prosthesis loosening, infection, wear or fretting corrosion, and metabolism [24].

The aim of the work was to characterize the microstructure, mechanical properties and corrosion resistance of conventional Co-Cr-Mo-W casting alloys as metal materials assigned for dental prosthetics elements. The research included microscopic observations with the use of light and electron scanning (SEM) microscopy, microhardness measurements as well as corrosion resistance tests in the environment of artificial saliva.

Materials and Methods

The following casting alloys were used in the research: Co-Cr-Mo-W produced by: Eisenbacher Dentalwaren ED GmbH (Robur 400), Bego Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co. (Wirobond 280), Feguramed GmbH (Combibond BST Triumph), Heraeus (Heraenium PW). The chemical compositions of the tested alloys are presented in TABLE 1.

TABELA 1. Składy chemiczne badanych stopów Co-Cr-Mo-W, % wag. TABLE 1. The chemical compositions of the tested alloys Co-Cr-Mo-W, wt%.

astek ag.) ent 6)	Nazwa handlowa Commercial Name			
Pierwia (% w? Elem (wt%	Robur 400	Wirobond 280	Combibond BST Triumph	Heraenium PW
Со	62.00	60.20	60.00	55.20
Cr	28.70	25.00	25.00	24.00
Мо	6.15	4.80	1.00	0.80
Si	0.42	< 2.00	1.00	1.00
Mn	0.50	< 2.00	< 1.00	0.80
W	1.11	6.20	9.00	15.00
С	0.54	<0.35	< 0.10	< 0.35
Fe	< 0.01	-	< 1.00	4.00
Ga	-	2.90	-	-
Nb	-	_	2.00	-
V	-	-	1.00	-

The test samples of \emptyset = 8 mm and h = 15 mm underwent mechanical treatment, which consisted of two consecutive processes: (1) mechanical grinding with abrasive papers (FEPA gradation 120-1200), (2) mechanical polishing including the final stages of sample preparation.

The initial polishing involved the use of diamond paste, with the preliminary gradation of 1 μ m, whereas, during the final polishing, the gradation of $\frac{1}{4} \mu$ m was applied. The grinding and polishing processes were performed with the use of a polishing-grinding machine by Struers. In order to reveal the microstructure of the examined materials, the samples underwent chemical etching with the application of the following etching reagents: 1 ml of HNO₃ (concentration 65%) + 3 ml of HCl (concentration 38%) and 3 ml of HNO₃ (concentration 65%) + 1 ml of HF (concentration 40%) + 1 ml of glycerol.

TABELA 2. Skład sztucznej śliny [15]. TABLE 2. Composition of artificial saliva [15].

Składnik Component	NaCl	KCI	KH ₂ PO ₄
llość [g/l] Quantity [g/l]	0.70	1.20	0.20
Składnik Component	NaHCO₃	Na₂HPO₄	KSCN
llość [g/l] Quantity [g/l]	1.50	0.26	0.33

Dla każdego stopu wyznaczono potencjał korozyjny oraz krzywą polaryzacji z prędkością zmiany potencjału wynoszącą 1 mV/s, na podstawie których określono ich właściwości korozyjne. Badania elektrochemiczne przeprowadzono w układzie trójelektrodowym, w którym elektrodę pracującą stanowiły badane stopy, elektrodą pomocniczą była elektroda platynowa, zaś elektrodą odniesienia elektroda chlorosrebrowa (Ag/AgCl w 3 mol/l KCl). Badania przeprowadzono na potencjostacie AutoLab PGSTAT302N.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe pozwoliły ujawnić mikrostrukturę badanych stopów Co-Cr-Mo-W. Materiały do badań obserwowano przy powiększeniu: 200x i 500x wykorzystując mikroskopię świetlną (RYS. 1 a, b - 4 a, c). Dodatkowo na RYS. 1 c - 4 c zamieszczono zdjęcia mikrostruktur wykonane za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego celem ujawienia szczegółów mikrostruktury.

Badania z zastosowaniem mikroskopii świetlnej i skaningowej wykazały, że analizowana struktura pierwotna badanych stopów, po krystalizacji posiadała mikrostrukturę dendrytyczną charakterystyczną dla materiałów odlewanych. Mikrostruktura ta jest chemicznie niejednorodna, złożona z austenitycznej osnowy składającej się z roztworu stałego kobaltu oraz chromu w rdzeniowej strukturze dendrytycznej. Według danych literaturowych [15,17,26-30] w obszarach międzydendrytycznych zlokalizowane są wydzielenia węglikowe $M_{23}C_6$ tj. $Cr_{23}C_6$ i typu MC, które występują w charakterystycznych pasmach dendrytów. Węgliki te stanowią główne źródło umocnienia materiału.

Uzyskane wyniki pomiarów mikrotwardości stopów Co--Cr-Mo-W pozwoliły stwierdzić, że najwyższą mikrotwardością cechował się stop o nazwie *Robur 400*, mikrotwardość badanej próbki wynosiła 488 HV0.1, najniższą zaś stop o nazwie *Wirobond 280*, mikrotwardość wynosiła ok. 360 HV0.1. Poszczególne wartości średnich mikrotwardości i odchyleń standardowych zamieszczono w TABELI 3. Wysoka twardość analizowanych materiałów jest pożądana, ponieważ przy leczeniu stomatologicznym ważne jest aby dany stop cechował się odpornością na zarysowania, zniszczenia oraz pęknięcia. Wzrost mikrotwardości prawdopodobnie jest silnie determinowany występowaniem wydzieleń węglikowych M₂₃C₆, które zapewniają umocnienie stopu. Twardość stopu zależy również od dyspersji, kształtu i rozmieszczenia węglików w stopie. The test samples were observed with the use of the LEICA DM 4000 light microscope. Additionally, the samples underwent microscopic observations with the application of the HITACHI S-3500N scanning electron microscope, equipped with an EDS analyzer by Noran.

The microhardness measurements were performed with the Vickers method, by means of a microhardness tester by Innovatest, load of 0.9807 N. On the basis of the obtained measurement results, the mean values of microhardness (HV0.1) and standard deviation were calculated.

The aim of the electrochemical measurements was an analysis of the corrosion behaviour of the tested alloys. The surface of the electrochemically tested alloys equalled 50 mm². Prior to the measurements, the samples Co-Cr alloys were polished with the use of abrasive papers made of silicon carbide (SiC) with the granularity of up to 4000. The corrosive environment was artificial saliva (pH = 6.8). The tests were carried out at 37°C. The composition of the artificial saliva is given in TABLE 2.

The polarization tests included open circuit potential as well as polarization measurements with the potential scan rate of 1 mV/s. The polarization curves were plotted with the use of a three-electrode system, where the auxiliary electrode was a platinum gauze, the working electrode was represented by the examined alloys and the reference electrode was Silver/Silver Chloride Electrode (SSCE) in 3 mol/l KCl. The measurements were carried out with the use of a potentiostat AutoLab PGSTAT302N.

Results and Discussions

The performed microscopic observations made it possible to reveal the microstructure of the examined Co-Cr-Mo-W alloys. The test materials were observed with the magnifications of 200x and 500x, by means of light microscopy (FIG. 1 a, b - 4 a, c). Additionally, FIGs 1 c - 4 c include microstructure images made with the use of an electron scanning microscope, with the purpose to reveal the microstructure details.

The examinations with the use of light and scanning microscopy showed that the analyzed primary structure of the tested alloys, after crystallization, has a dendritic microstructure characteristic for cast materials. This microstructure is chemically homogeneous and consists of an austenitic matrix formed by a solid cobalt solution and chromium in the core dendritic structure. According to the literature data [15,17,26-30], in the interdendritic spaces, carbide precipitates $M_{23}C_6$ are located, i.e. $Cr_{23}C_6$ and MC type distributed in the characteristic dendritic bands. These carbides constitute the main source of the material's reinforcement.

The obtained microhardness test results for the Co-Cr-Mo-W alloys made it possible to state that the highest microhardness is exhibited by the alloy named *Robur* 400 (the microhardness of the examined sample equaled 488 HV0.1), whereas the lowest value was shown by the alloy named *Wirobond* 280, whose microhardness equalled about 360 HV0.1. The particular mean microhardness and standard deviation values are presented in TABLE 3. The high hardness of the analyzed materials is desirable, as, in stomatological treatment, it is important for the alloy to be resistant to scratches, damage and cracks. The increase in microhardness is strongly determined by the presence of carbide precipitates $M_{23}C_6$, which provide a much stronger reinforcement of the alloy. The alloy's hardness depends on the dispersion, shape and distribution of the carbides.



RYS. 1. Mikrostruktura stopu Robur 400: a) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 200x, b) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 500x, c) obraz wykonany przy pomocy SEM. FIG. 1. Microstructures of Robur 400 alloy: a) light microscopy, magnification 200x, b) light microscopy, magnification 500x, c) SEM.



RYS. 2. Mikrostruktura stopu Wirobond 280: a) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 200x, b) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 500x, c) obraz wykonany przy pomocy SEM. FIG. 2. Microstructures of Wirobond 280 alloy: a) light microscopy, magnification 200x, b) light microscopy, magnification 500x, c) SEM.



RYS. 3. Mikrostruktura stopu Combibond BST Triumph: a) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 200x, b) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 500x, c) obraz wykonany przy pomocy SEM.

FIG. 3. Microstructures of Combibond BST Triumph alloy: a) light microscopy, magnification 200x, b) light microscopy, magnification 500x, c) SEM.



RYS. 4. Mikrostruktura stopu Heraenium PW: a) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 200x, b) obraz wykonany przy wykorzystaniu mikroskopii świetlnej pow. 500x, c) obraz wykonany przy pomocy SEM. FIG. 4. Microstructures of Heraenium PW alloy: a) light microscopy, magnification 200x, b) light microscopy, magnification 500x, c) SEM.

	Rodzaj badanego stopu Type of investigated alloy			
	Robur 400	Wirobond 280	Combibond BST	Heraenium PW
HV0.1	488	359	410	376
Odchylenie standardowe Standard deviation	12	28	20	20

-0.15 -0.20 Potencjał [V] vs. Ag/AgCl -0.25 Potential [V] vs. SSCE -0.30 -0.35 <u>Zanurzenie w roztworze sztucznej śliny w 37⁰C</u> Immersion in artificial saliva solution at 37 °C -0.40 Combibond BST Triumph -0.45 Wirobond 280 -0.50 Robur 400 Heraenium PW -0.55 -0.60 0.0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 Czas / Time [h]

TABELA 3. Wyniki pomiarów mikrotwardości HV0.1 i odchyleń standardowych badanych stopów Co-Cr-Mo-W. TABLE 3. The results of microhardness measurements HV0.1 and standard deviations of the tested alloys Co-Cr-Mo-W.

RYS. 5. Potencjał obwodu otwartego (OCP) w funkcji czasu dla stopów kobaltu w roztworze sztucznej śliny, temp. 37°C. FIG. 5. Evolution of open circuit potential vs. time of tested cobalt alloys in artificial saliva, temp. 37°C.

Dla każdego ze stopów określono wartość potencjału bezprądowego w funkcji czasu w badanym roztworze. RYS. 5 przedstawia zmianę potencjału korozyjnego w czasie. Potencjał korozyjny wzrastał dla każdego stopu i osiągnął stabilną wartość po około 2 godzinach. Najwyższy poziom potencjału jest zauważalny dla stopu *Wirobond 280 PW*, który osiąga wartość stabilną około –0,15 V vs. Ag/AgCI. Dla pozostałych stopów potencjał ten jest nieco niższy i wynosi około –0,20 V dla stopu *Heraenium PW* oraz –0,30 V dla stopów *Combibond BST Triumph* i *Robur PW* vs Ag/ AgCI. Przebieg zależności E = f(t) dla wszystkich stopów jest charakterystyczny dla materiałów dobrze pasywujących się.

Podobną charakterystykę zmiany potencjału bezprądowego widać dla dwóch stopów kobaltu: *Robur 400* i *Combibond BST Triumph*, w których potencjał ten początkowo gwałtownie wzrasta przez 30 min, po czym utrzymuje już stały poziom. Nieco odmienny przebieg krzywej potencjału bezprądowego ma stop *Wirobond 280*, który po pierwszych 30 min zachowuje się podobnie, jak dwa wcześniej opisane stopy, natomiast po tym czasie wartość potencjału wzrasta i po około 4 godzinach osiąga wartość wynoszącą ok. -0,15 V, stale nieznacznie wzrastając. For each tested alloy, the open circuit potential as a function of time in the examined solution was determined. Free corrosion potential (FIG. 5) increased for each alloy and reached a stable value after about 2 hours. The highest potential value was recorded for the *Wirobond 280* alloy, which reached its stable value of about -0.15 V vs. SSCE. For the other alloys, the potential was slightly lower and equalled -0.20 V for the *Heraenium PW* and -0.30 V for the *Combibond BST Triumph* and *Robur PW* vs. Ag/AgCI. The course of the relations E = f(t) for all the alloys is characteristic of well-passivating materials.

A similar characteristic of the change in the open circuit potential can be observed in the case of the two cobalt alloys: *Robur 400* and *Combibond BST Triumph*, in which the potential initially rapidly increases for 30 minutes, after which it maintains a constant level. A slightly different course of the open circuit potential curve is exhibited by the *Wirobond 280* alloy, which, after the initial 30 minutes, behaves similarly to the two other alloys, yet, after about 2 hours, its potential partially increases and after 4 hours, the potential is about -0.15 V and slightly increases.

Na każdej próbce stopu, wykonano klasyczne krzywe polaryzacyjne w roztworze sztucznej śliny (RYS. 6). Dla wszystkich badanych stopów krzywe polaryzacyjne mają podobny charakter. Powyżej potencjału bezprądowego istnieje plateau do wartości 0,55 V vs. Ag/AgCl, a następnie widoczny jest wyraźny wzrost gęstości prądu anodowego.

Przebiegi krzywych są charakterystyczne dla materiałów o wysokiej odporności na korozję. Badane stopy charakteryzują się szerokim obszarem pasywnym (-0,15 – 0,40 V) o bardzo niskiej gęstości prądu (około 0,005 mA/cm²). Płaski przebieg krzywej polaryzacji i małe gęstości prądu anodowego są charakterystyczne dla metali dobrze pasywujących się. Zachowanie elektrochemiczne stopów Co-Cr w dużej mierze zależy od za-



RYS. 6. Krzywa polaryzacji anodowej stopów Co-Cr w roztworze sztucznej śliny, temperatura 37°C. FIG. 6. Anodic polarization curve for Co-Cr alloys in artificial saliva at 37°C.

wartości w stopie chromu i molibdenu, pierwiastków, które przyczyniają się do pasywacji stopów. Szereg przeprowadzonych badań nad odpornością korozyjną stopów Co-Cr-Mo wskazuje, że skład filmu ochronnego tworzącego się na powierzchni stopów jest zdominowany obecnością Cr₂O₃ z niewielkim dodatkiem tlenków kobaltu i molibdenu [31]. Na krzywych polaryzacyjnych rozpatrywanych stopów widoczny jest wyraźny pik anodowego utleniania przy wartości potencjału wynoszącej -0,25 V. Pik ten jest związany z utlenianiem kobaltu. Jony kobaltu reagując z cząsteczkami wody przyczyniają się do tworzenia warstwy pasywnej na powierzchni stopów. Region transpasywny dla wszystkich stopów rozpoczyna się od wartości około 0,65 V vs. Ag/AgCl i jest związany z intensywnym utlenianiem kobaltu Co(III) do Co(IV) [26].

Wnioski

Na podstawie danych literaturowych i wyników badań własnych poniżej przedstawiono zależności pomiędzy mikrostrukturą, właściwościami mechanicznymi i odpornością korozyjną badanych stopów kobaltu dedykowanych sektorowi stomatologicznemu:

1. Strukturę pierwotną odlewów komercyjnych stopów Co-Cr-Mo-W stanowiły krystality o zróżnicowanej geometrii oraz wielkości. Osnowę badanych materiałów tworzy niejednorodny chemicznie roztwór stały chromu, molibdenu, wolframu i węgla w β -Co. W granicach krystalitów oraz w przestrzeniach międzydendrytycznych występują wydzielenia węglików typu $M_{23}C_6$ i MC.

2. Najwyższą mikrotwardość z pośród badanych materiałów posiada stop *Robur 400* (488 HV0.1). Na wzrost mikrotwardości prawdopodobnie ma wpływ ilość, typ i rozmieszczanie węglików w obszarach międzydendrytycznych mogących występować w stopach Co-Cr-Mo-W.

3. Samorzutny proces utleniania stopów powodował wzrost wartości potencjału bezprądowego w początkowym okresie pomiaru. Potencjał korozyjny wzrastał dla każdego stopu i osiągnął stabilną wartość po około 2 godzinach. Najwyższy poziom potencjału jest zauważalny dla stopu *Wirobond 280*, który osiąga wartość potencjału bezprądowego wynoszącą około –0,15 V vs. Ag/AgCl po około 4 godzinach ekspozycji w roztworze sztucznej śliny. For each alloy sample, classic polarization curves were made (linear sweep voltammetry) in the solution of artificial saliva (FIG. 6). For all the examined alloys, the polarization curves have a similar character. Above the open circuit potential, there is a plateau up to the value of 0.55 V vs. SSCE. We can then observe an increase of the anodic current density.

The progress of the curves is characteristic for materials of a high corrosion resistance. The tested alloys are characterized by a wide passive region (-0.15 - 0.40 V) of a very low current density (about 0.005 mA/cm²). The flat course of the polarization curve and the low densities of the anodic current are characteristic of well-passivating metals. The

electrochemical corrosion of Co-Cr alloys is significantly dependent on the content of chromium and molybdenum, which largely contribute to alloy passivation. A number of tests performed on the corrosion resistance of the Co-Cr-Mo alloys points to the fact that the content of the protective film which forms at the surface of the alloys is dominated by the presence of Cr_2O_3 with a minor addition of cobalt and molybdenum oxides [31]. On the polarization curves, the oxidation peak is visible at -0.25 V for the tested alloys. This peak is related to the oxidation of cobalt. Cobalt ions react with water molecules and the passive film is formed. The transpassive region for all the alloys begins with the value of about 0.65 V vs. SSCE and it is related to the intense oxidization of cobalt Co(III) to Co(IV) [26].

Conclusions

Based on the literature data and the results of our own studies, presented below are the relations between the microstructure, the mechanical properties and the corrosive resistance of the examined cobalt alloys dedicated to the stomatological sector:

1. The primary structure of the Co-Cr-Mo-W alloys was constituted by crystallites of a diversified geometry and size. The matrix of the tested materials is formed by a chemically homogeneous solution of chromium, molybdenum, tungsten and carbon in β -Co. In the crystallite boundaries and the interdendritic areas, we can observe precipitations of $M_{23}C_6$ - and MC-type carbides.

2. The highest microhardness of the examined materials is exhibited by the Robur 400 alloy (488 HV0.1). The increase of the microhardness is probably affected by the amount, type and distribution of the carbides in the interdendritic areas, which can be present in Co-Cr-Mo-W alloys.

3. The spontaneous process of alloy oxidation caused an increase in the values of the open circuit potential at the initial stage of the measurement. The corrosion potential increased for each alloy and it reached a stable value after about 2 hours. The highest potential level was observed for the *Wirobond 280* alloy, which reached the value equal to about -0.15 V vs. SSCE after 4 hours of exposition to artificial saliva.

Dla pozostałych stopów potencjał ten jest nieco niższy i wynosi około –0,30 V vs. Ag/AgCl. Przebieg zależności E= f(t) dla wszystkich stopów jest charakterystyczny dla materiałów dobrze pasywujących się.

4. Dla wszystkich badanych stopów krzywe polaryzacyjne mają podobny charakter. Przebiegi krzywych są charakterystyczne dla materiałów o wysokiej odporności na korozję. Badane stopy charakteryzują się szerokim obszarem pasywnym (-0,15 – 0,40 V) o bardzo niskiej gęstości prądu (około 0,005 mA/cm²). Płaski przebieg krzywej polaryzacji i małe gęstości prądu anodowego są charakterystyczne dla metali dobrze pasywujących się.

Podziękowania

Praca realizowana jest w ramach badań statutowych nr 11.11.110.299 AGH.

Piśmiennictwo

[1] Lin H-Y., Bumgardner J.D.: Changes in the surface oxide composition of Co–Cr–Mo implant alloy by macrophage cells and their released reactive chemical species. Biomaterials 25 (7-8) (2004) 1233-1238.

[2] Balagna C., Spriano S., Faga M.G.: Characterization of Co--Cr-Mo alloys after a thermal treatment for high wear resistance. Materials Science and Engineering C 32 (2012) 1868-1877.

[3] Hanawa T.: Evaluation techniques of metallic biomaterials in vitro.
Science and Technology of Advanced Materials 3 (2002) 289-295.
[4] Julián L.C., Muñoz A.I.: Influence of microstructure of HC CoCrMo biomedical alloys on the corrosion and wear behavior in simulated body fluids. Tribology International 44 (2001) 318-329.
[5] Cawley J., Metcalf J.E.P., Jones A.H., Band T.J., Skupien D.S.: A tribological study of cobalt chromium molybdenium alloys used in metal –on-metal resurfacing hip arthoplasty. Wear 255 (2003) 999-1006.

[6] Lassila L.V.J., Vallittu P.K.: Effect of water and artificial saliva on the low cycle fatigue resistance of cobalt-chromium dental alloy. The Journal of Prosthetic Dentistry 80 (6) (1998) 708-713.

[7] Lee S-H., Takahashi E., Nomura N., Chiba A.: Effect of carbon addition on microstructure and mechanical properties of a wrought C-Cr-Mo implant alloy. Materials Transactions 47(2) (2006) 287-290.
[8] Zhuang L.Z., Lander E.W.: Effects of alloy additions on the microstructures and tensile properties of cast Co-Cr-Mo alloy used for surgical implants. Journal of Materials Science 24 (1989) 4324-4330.

[9] Lee S-H., Nomura N., Chiba A.: Significant improvement in mechanical properties of biomedical Co-Cr-Mo alloys with combination of N and Cr-enrichment. Materials Transactions 49 (2) (2008) 260-264.

[10] DIN EN ISO 22674 Instructions ROBUR 400®

[11] ISO 9693 Instructions Wirobond 280®

[12] EN ISO 22674 Instructions Combibond® BST Triumph

[13] EN ISO 9693 Instructions Combibond® BST Triumph

[14] DIN EN ISO 9693 Instructions Heraenium® Pw

[15] 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.

[16] Heda H.: Engineering materials for biomedical applications, Publisher University of Technology, Poznan 2011 (in Polish).

[17] Yamanaka K., Mori M., Chiba A.: Effects of carbon concentration on microstructure and mechanical properties of as cast nickiel –free Co-28Cr-9W-based dental alloys. Materials Science and Engineering C 40 (2014) 127-134. For the remaining alloys, this potential was slightly lower and it equalled about -0.30 V vs. SSCE. The course of the relations E= f(t) for all the alloys is characteristic of wellpassivating materials.

4. For all the examined alloys, the polarization curves have a similar character. The shape of the curves is characteristic for materials of a high corrosion resistance. The tested alloys characterize in a wide passive region (-0.15 - 0.40 V) of a very low current density (about 0.005 mA/cm²). The flat course of the polarization curve and the low densities of the anodic current are characteristic of well-passivating metals.

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 AGH.

References

[18] 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. [19] Komorek Z., Jóźwiak S., Kuchta M.: The influence of production conditions on the strength of Co-Cr-Mo-C stomatology alloy. Archives of Foundry Engineering 6(18) (2006) 279-282.

[20] Taylor R.N.J., Waterhouse R.B.: Journal Materials Science 18(11) (1983) 3265-3280.

[21] Clemow A.J.T., Daniell B.L.: Solution treatment behavior of Co-Cr-Mo alloy, Journal of Biomedical Materials Research Part A 13(2) (1979) 265-279.

[22] Ciszewski B., Przetakiewicz W.: Modern materials in technology, Publisher Bellona, Warszawa 1993 (in Polish).

[23] Spiechowicz E.: Prosthetics Dental, Medical Publishing PZWL, Warszawa 2008 (in Polish).

[24] Hsu R. W-W., Yang C-C., Huang C-A., Chen Y-S.: Electrochemical corrosion studies on Co–Cr–Mo implant alloy in biological solutions. Materials Chemistry and Physics 93 (2005) 531-538.

 [25] PN-EN ISO 10993-15. Biological evaluation of medical devices – Vol. 15, 2005 (in Polish).

[26] Metikos-Huković M., Pilić Z., Babić R. & Omanović D.: Influence of alloying elements on the corrosion stability of CoCrMo implant alloy in Hank's solution. Acta Biomaterialia 2 (2006) 693-700.

[27] Augustyn-Pieniążek J., Łukaszczyk A., Zapała R.: Microstructure and corrosion resistance characteristics of Co-Cr-Mo alloys designed for prosthetic materials. Archives of Metallurgy and Materials 58 (2013) 1281-1285.

[28] Augustyn-Pieniążek J., Łukaszczyk A., Szczurek A., Sowińska K.: Structure and properties of dental cobalt alloys used to perform framed dentures. Materials Science 2 (2013) 116-120.

[29] Augustyn-Pieniążek J., Stopka J., Ciaputa K.: Technology of metal-ceramic crowns impact on the microstructure and mechanical properties of dental materials, Modern Dental Technician 3 (2013) 40-44.

[30] Loch J., Łukaszczyk A., Augustyn-Pieniążek J., Krawiec H.: Electrochemical behaviour of Co-Cr and Ni-Cr dental alloy. Solid State Phenomena 227 (2015) 451-454.

[31] Valero Vidal C., Igual Muñoz A.: Study of the adsorption process of bovine serum albumin on passivated surfaces of CoCrMo biomedical alloy. Electrochimica Acta 55 (2010) 8445-8452.

•••••

10

DEGRADACJA HYDROLITYCZNA RUSZTOWAŃ KOMÓRKOWYCH FORMOWANYCH Z TERPOLI-MERÓW; L-LAKTYDU, GLIKOLIDU I TMC, ORAZ L-LAKTYDU, GLIKOLIDU I ε-KAPROLAKTONU

Marta Kot^{1*}, Lidia Wawryło¹, Piotr Rychter^{1,2}, Wojciech Prochwicz¹, Anna Smola², Piotr Dobrzyński^{1,3}

 ¹ Akademia im. Jana Długosza w Częstochowie, ul. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa
 ² Institute of Polymers Bulgarian Academy Sciences Acad. G. Bonchev Str., block 103-A, BG - 1113 Sofia, Bułgaria
 ³ Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrzu, ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze
 *E-Mail: Marta.kot@ajd.czest.pl

Streszczenie

Głównym celem prezentowanej pracy było zbadanie przebiegu degradacji hydrolitycznej porowatych rusztowań komórkowych wykonanych z bioresorbowalnych terpolimerów z pamięcią kształtu; L-laktydu, glikolidu i węglanu trimetylenu, oraz L-laktydu, glikolidu i ε-kaprolaktonu.

W trakcie prowadzonej hydrolizy odnotowywano spadki masy i średnich mas cząsteczkowych, oraz niewielkie zmiany chłonności wody badanych materiałów. Za pomocą mikroskopii skaningowej (SEM) śledzono zmiany morfologii powierzchni rusztowań zachodzące podczas prowadzonej degradacji in vitro.

Przeprowadzone badania wykazały, że podłoża komórkowe formowane z terpolimerów L-LA/GA/ o-TMC i L-LA/GA/ɛ-CL ulegają stopniowej degradacji hydrolitycznej, a udział enzymu – lipazy wyraźnie przyspieszał ten proces zwłaszcza w wypadku rusztowania formowanego z kopolimeru zawierającego mikrobloki węglanowe. Najniższy ubytek masy odnotowano dla próbki zawierającej jednostki węglanowe, wynosił on około 10% masy wyjściowej rusztowań po 112 dniach, a w wypadku obecności lipazy masa tego materiału była niższa o ponad 24%.

Wysoki stopień porowatości otrzymanych rusztowań, a co za tym idzie ich duża powierzchnia właściwa powoduje, że materiały te podatne są w znacznie większym stopniu na degradację enzymatyczną, niż podobne lite materiały wykonane z tych samych terpolimerów. Spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej był obserwowany w przypadku obu rodzajów terpolimerów, jednak dla terpolimeru z jednostkami kaproilowymi był on wyraźnie większy (po 112 dniach z około 40 tys. g/mol do około 2 tys. g/ mol). Warte uwagi jest to, że stopień degradacji próbek wykonanych z terpolimeru L-LA/GA/o-TMC, podczas trzech pierwszych tygodni, był stosunkowo mały, a dopiero wyraźne silne przyspieszenie tego procesu nastąpiło po 30 dniach. W przypadku degradacji prowadzonej w obecności lipazy zanotowano w czasie 112 dni spadek liczbowo średniej masy cząsteczkowej tego materiału z około 40 tys. g/mol do 9 tys. g/mol.

HYDROLYTIC DEGRADATION OF BIODEGRADABLE SCAFFOLDS BASED ON L-LACTIDE/ GLYCOLIDE/TMC AND L-LACTIDE/ GLYCOLIDE/ε-CAPROLACTONE TERPOLYMERS

Marta Kot^{1*}, Lidia Wawryło¹, Piotr Rychter^{1,2}, Wojciech Prochwicz¹, Anna Smola³, Piotr Dobrzyński^{1,3}

¹ JAN DLUGOSZ UNIVERSITY IN CZESTOCHOWA,

13/15 Armii Krajowej Ave., 42-200 Czestochowa, Poland ² Institute of Polymers Bulgarian Academy Sciences Acad. G. Bonchev Str., block 103-A, BG - 1113 Sofia, Bulgaria ³ Centre of Polymer and Carbon Materials,

POLISH ACADEMY OF SCIENCES,

34 M. Sklodowskiej-Curie St., 41-819 Zabrze, Poland *e-mail: marta.kot@ajd.czest.pl

Abstract

The main aim of this work was to check the degradation course of polymeric scaffolds in medium with and without of enzyme - pancreatic lipase. Based on the conducted degradation studies the usefulness of the formed scaffolds was confirmed. Scaffolds have been prepared using two types of terpolymers varying in composition: L-lactide, glycolide, trimethylene carbonate, and L-lactide, glycolide and ε -caprolactone.

The weight loss, water absorption, molecular weight distribution (by GPC) as well as changes in surface morphology using SEM during degradation process have been evaluated.

The results have proved the degradation process of scaffolds, both in the hydrolytic and enzymatic ways has been occurred. Addition of an enzyme - lipase facilitates the degradation process of the samples, especially those containing carbonate segments. High porosity of the scaffolds and their huge specific surface area make these materials more susceptible to degradation as compared to solid materials i.e. blown, extruded polymers. Decrease in the number average molecular weight was observed in the case of both degraded scaffolds; however in that containing caproyl units it was higher. It is worth noting, that degradation rate of sample L-LA/GA/o-TMC during first three weeks is quite slow showing almost the same behaviour for both enzymatic and hydrolytic degradation. From the tissue engineering point of view the slow degradation process of the terpolymer L-LA/GA/o-TMC during first two - three weeks is very promising because cells would have enough time for migration, adhesion and proliferation.

Keywords: terpolymers, tissue engineering, cell scaffolds, biodegradable polymers, polymer degradation

[Engineering of Biomaterials 130 (2015) 10-19]

Z punktu widzenia inżynierii tkankowej powolny proces degradacji terpolimeru L-LA/GA/o-TMC w ciągu pierwszych dwóch - trzech tygodni jest bardzo korzystny, ponieważ komórki mają wystarczająco dużo czasu na migrację, adhezję i namnażanie.

Słowa kluczowe: terpolimery, inżynieria tkankowa, rusztowania komórkowe, polimery biodegradowalne, degradacja polimerów

[Inżynieria Biomateriałów 130 (2015) 10-19]

Wprowadzenie

W metodach leczenia chirurgicznego ubytków kostnych zastosowanie przeszczepów allogenicznych czy autogenicznych pomimo wielu swoich zalet ma jednak zasadnicze ograniczenia związane z ryzykiem infekcji, koniecznością leczenia immunosupresyjnego i uszkodzeniem zdrowej tkanki dawcy. W czasach, gdy przeszczepy auto- i allogeniczne nie spełniają często stawianych im wymagań, duże nadzieje na rozwiązanie wszystkich wyżej wymienionych problemów daje wytworzenie za pomocą metod inżynierii tkankowej biologicznych zamienników. W sytuacji, gdy nie jest możliwa regeneracja uszkodzonej tkanki w naturalny sposób, konieczne jest wprowadzenie w miejsce ubytku sztucznej substancji międzykomórkowej wspomagającej proces odbudowy. Podłoże komórkowe służy zapełnieniu pustej przestrzeni w miejscu ubytku do czasu, aż zostanie odbudowana uszkodzona tkanka. Podłoże komórkowe powinno cechować się stabilnością kształtu i tymczasową odpornością na biodegradację po implantacji, a po spełnieniu założonych przy projektowaniu funkcji powinno ulegać stopniowej degradacji i resorpcji w organizmie na rzecz naturalnej matrycy pozakomórkowej. Tworzenie porowatych trójwymiarowych struktur umożliwia komórkom dostęp do składników odżywczych i metabolitów oraz zapewnienia odpowiednią powierzchnię do osadzania i namnażania się komórek [1-3].

Podłoża te formowane są coraz częściej z bioresorbowalnych kopoliestrów lub poliestrowęglanów alifatycznych. Materiały takie mogą wykazywać efekt pamięci kształtu, co pozwala na otrzymanie nowych "inteligentnych" materiałów dla konkretnych zastosowań, przykładowo podłoży samodopasowujących swoje wymiary do miejsc implantacji, lub rusztowań komórkowych, które zdolne są poprzez zmianę średnicy porów w trakcie prowadzonej hodowli komórek in vitro, na zwiększenie efektywności prowadzonej hodowli.

Jedną z zasadniczych własności, które muszą spełniać materiały przeznaczone do formowania podłoży komórkowych jest możliwość ich degradacji w środowisku biologicznym. Tempo tej degradacji i jej przebieg powinny być skorelowane z szybkością namnażania się komórek i przerastania tkanką. Profil degradacji rusztowań komórkowych jest zależny nie tylko od składu, ale również od mikrostruktury łańcucha kopolimeru matrycy oraz morfologii i porowatości tego materiału [4].

W niniejszej pracy zostały przedstawione wyniki badań degradacji porowatych rusztowań komórkowych terpolimerów wykonanych z L-laktydu/glikolidu/trimetylowęglanu (L-LA/GA/o-TMC) i L-laktydu/glikolidu/ɛ-kaprolaktonu (L-LA/GA/ɛ-CL), jako bioresorbowalnych materiałów wykazujących pamięć kształtu, do potencjalnego zastosowania w inżynierii tkankowej.

Introduction

The allogeneic or autogenous methods of surgical treatment of bone defects, despite their many advantages have fundamental limitations associated with the risk of infection, the necessity of immunosuppressive therapy as well as cause damage of donor's healthy tissue. Since the auto- and allogeneic transplants do not often meet their requirements, great hopes gives preparation of biological substitutes using tissue engineering methods. If the regeneration of damaged tissue in a natural way is not possible, it is necessary to fill the bone defect with an artificial extracellular matrix supporting the process of reconstruction. Three dimensional, porous scaffolds allow for colonization of cells in whole space of material until the damaged tissue will be finally regenerated. This material meets the criteria of shape stability and temporary biodegradation resistance after implantation. After fulfiling its function, scaffolds should start to degrade and become bioresorbable by human body. The 3D structure of fabricated medium allows transfer of the nutrients and metabolites of cells providing also appropriate surface for their adhesion and proliferation [1-3].

Scaffolds for cell culturing are increasingly formed using bioresorbable copolyesters or aliphatic polyester-carbonates. Moreover, these porous, "smart" carriers exhibit shape memory behaviour. It is a valuable property that can be used in many tissue engineering techniques. Such feature allows to conduct more effective and efficient cell culturing. The scaffolds with the "temporary" shape have relatively larger pores than the optimum size, which will facilitate cell seeding and adhesion and greatly increase the accessibility of the entire volume of the carrier.

One of the fundamental properties that must comply the materials for the formation of biomaterials is the possibility of its biodegradation in the body environment. The rate of degradation of the scaffold should be correlated with the rate of cellular proliferation in the extent avoiding the production of excessive amount of rebuilded tissue. Degradation profile of porous scaffolds is dependent not only on the composition but also the chain microstructure of the used copolymer, the scaffold morphology and porosity of this material [4].

In this work the results concerned with the in vitro degradation of porous, three dimensional terpolymers made from L-lactide/glycolide /trimethylene carbonate (L-LA/ GA/o-TMC) and L-lactide/glycolide/ ϵ -caprolactone (L-LA/ GA/ ϵ -CL) as a potential material useful for tissue engineering have been presented.

Materials and Methods

Materials

Three-dimensional scaffolds for cell culture have been formed from two terpolymers: sample LP212 - L-lactide/ glycolide/oligo trimethylene carbonate terpolymer (L-LA/GA/ o-TMC) and sample LW1 - L-lactide/glycolide/ ϵ -caprolactone terpolymer (L-LA/GA/ ϵ -CL). Monomers used in the synthesis reaction were as following: L-lactide (L-LA), glycolide (GA) (PuracBiomaterials, Glaco LTD), ϵ -caprolactone (ϵ -CL) (Acros Organik). To synthesize trimethyl carbonate oligomer (o-TMC) the cyclic monomer - trimethylene carbonate (Huizhou Foryou Medical) 99% 1,4-butanediol (POCH Gliwice, Poland) and acetylacetonate, zinc (II) (Zn(acac)₂) (Sigma Aldrich) were used. The zirconium acetylacetonate (IV) (Zr(acac)₄ (Sigma Aldrich) was used as an initiator for ROP reactions.

¹² Materiały i metody

Materiały

Trójwymiarowe rusztowania do hodowli komórek zostały utworzone za pomocą dwóch terpolimerów: LP212 - terpolimeru L-laktydu/glikolidu/oligowęglanu trimetylenu (L-LA/GA/o-TMC) i LW1L - terpolimeru laktydu/glikolidu/ ε-kaprolaktonu (L-LA/GA/ε-CL). Do syntezy terpolimeru wykorzystano monomery L-laktydu (L-LA), glikolidu (GA) (PuracBiomaterials, Glaco LTD), ε-kaprolaktonu (ε-CL) (Acros Organik)). W syntezie oligomeru węglanu trimetylu (o-TMC) wykorzystano cykliczny monomer - węglan trimetylenu (Huizhou Foryou Medical). Jako koinicjator oligomeryzacji TMC stosowano 1,4-butandiol 99% (1,4-BD) (POCH Gliwice, Polska). Acetyloacetonian cynku (II) (Zn(acac)₂) (Sigma Aldrich Corp.) był katalizatorem tej oligomeryzacji, a acetyloacetonian cyrkonu (IV) (Zr(acac)₄) był inicjatorem reakcji ROP. Polimery rozpuszczano w chloroformie (POCH Gliwice) i wytrącano w alkoholu metylowym 99,8% (POCH Gliwice). Degradację prowadzono w środowisku wodnym (woda zdemineralizowana) buforowanym (0,13M bufor PBS o pH = 7,4). Jako czynnika porotwórczego użyto kryształki NaCl (frakcja 350-450 µm) (POCH Gliwice). Modelowym enzymem zastosowanym w badaniach był enzym lipazy trzustkowej (lipase HP- Hog pancreas) (EC 3.1.1.3, 22,7 U/mg) (Sigma AldrichCorp).

Aparatura

Spektroskopia magnetycznego rezonansu protonowego ¹H NMR

Zmiany składu terpolimerów podczas degradacji wyznaczono na podstawie widm ¹H NMR otrzymanych za pomocą spektrometru wysokiej rozdzielczości Avance II Ultrashield Plus firmy Bruker 600 MHz stosując jako rozpuszczalnik deuterowany chloroform (CDCl₃) i TMS jako wewnętrzny standard.

Chromatografia żelowa GPC

Do wyznaczenia liczbowo średniej masy cząsteczkowej (M_n) oraz rozrzutu mas cząsteczkowych PDI (M_w/M_n) wykorzystano chromatograf GPC Spectra Phisics SP8800 wyposażony w kolumny Styragel 103, 104, 500A i detektor refrakcyjny Shoedex SE 61. Fazę ruchomą stanowił chloroform o przepływie 1,0 ml/min.

Skaningowa kalorymetria różnicowa DSC

Do badań właściwości termicznych, takich jak: temperatura zeszklenia (T_g), temperatura topnienia (T_m), ciepło topnienia fazy krystalicznej (Δ H_m), terpolimerów L-LA/ GA/o-TMC i L-LA/GA/ ϵ -CL użyto kalorymetru DSC 2010 TA Instruments. Kalibrację wykonano przy użyciu galu i indu. Szybkość grzania wynosiła 20°C/min.

Skaningowa mikroskopia elektronowa SEM

Skaningowy mikroskop elektronowy SEM VEGA3 firmy TESCAN posłużył do badań struktury i zmian morfologicznych na powierzchni oraz we wnętrzu porowatych materiałów wynikających z postępującej degradacji. W celu zminimalizowania wpływu energii strumienia elektronów na obserwowane próbki zastosowano napięcie przyspieszające elektrony 1-2 kV. Próbki nie były również powlekane warstwą przewodzącą, w celu nie zaburzania rzeczywistej morfologii powierzchni badanych rusztowań. The final terpolymers were dissolved in chloroform (POCH Gliwice) and precipitated in methyl alcohol 99.8% (POCH Gliwice). Degradation was carried out in an aqueous medium (deionised water) buffered with 0.13M PBS, pH = 7.4). Crystals of sodium chloride NaCl (fraction 350-450 μ m, POCH Gliwice) has been used as porogens for scaffold preparation. The enzyme pancreatic lipase (HP-Hog pancreas lipase) (EC 3.1.1.3, 22.7 U/mg) (Sigma Aldrich) has been used for enzymatic degradation experiment.

Equipment

Spectroscopy ¹H NMR

Changes in composition of the terpolymers during degradation were determined from NMR spectra ¹H obtained with a high resolution spectrometer Avance II Plus Ultrashield Bruker 600 MHz using deutered chloroform as a solvent (CDCl₃) and (TMS) as internal standard.

Gel permeation chromatography GPC

The number average molecular weight (M_n) and the molecular weight distribution PDI (M_w/M_n) of degraded samples have been determined using chromatograph Physics Spectra SP8800 equipped with Styragel columns 103, 104, 500A and refractive index detector 61 Shoedex SE. The mobile phase was chloroform with a flow rate of 1.0 ml/min.

Differential scanning calorimetry DSC

Thermal properties of terpolymers such as glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m), heat of fusion of the crystalline phase (ΔH_m) were determined using the calorimeter DSC 2010 TA Instruments. Calibration was performed using gallium and indium. Heating rate was 20°C/min.

Scanning electron microscopy SEM

Scanning electron microscope (SEM) was used to study the structure and morphological changes of the surface and interior of porous materials ongoing during degradation process. To minimize the impact energy of the electron beam on the analysed sample, the electron accelerating voltage 1-2 kV has been used. The samples were not coated with the conductive layer in order maintain actual morphology of investigated scaffolds.

Research methodology

Terpolymers were synthesized via ring-opening polymerization using low-toxicity zirconium (IV) acetylacetonate as an initiator. Ring opening polymerization of the mentioned terpolymer has been previously described in details [4,6].

Oligomerization of TMC

Synthesis of L-LA/GA/o-TMC terpolymer was carried out according to the two-stages synthesis reaction already described [6]. The first step is the oligomerisation of trimethylene carbonate using 1,4-butanediol as co-initiator and $Zn(acac)_2$ as the catalyst. The reaction was carried out for 3 hours in the melt at 120°C under argon in a glass reactor equipped with a magnetic stirrer.

Obtained oligomer, having an average molecular weight of about 5000 g/mol, was used as a macroinitiator for the copolymerization of L-lactide and glycolide.

Metodyka badań

Prace obejmowały syntezę terpolimerów w wyniku reakcji polimeryzacji otwarcia pierścienia ROP z odpowiednich jednostek monomerycznych. Otrzymano terpolimery L-LA/GA/o-TMC i L-LA/GA/ɛ-CL. Zsyntezowane polimery zostały użyte do formowania rusztowań komórkowych.

Oligomeryzacja TMC

Proces otrzymywania terpolimeru L-LA/GA/o-TMC prowadzono zgodnie z metodą syntezy opracowaną wcześniej [5]. Proces jest dwuetapowy. Pierwszym etapem jest oligomeryza-

cja węglanu trimetylenu przy użyciu 1,4-butandiolu jako koinicjatora i Zn(acac)₂ jako katalizatora reakcji. Reakcję oligomeryzacji prowadzono w szklanym reaktorze, pod poduszką argonu i z ciągłym mieszaniem, przez 3 h, w temperaturze 120°C. Otrzymany oligomer, o średniej masie cząsteczkowej około 5000 g/mol wykorzystano, jako makroinicjator w następnym etapie syntezy – kopolimeryzacji L-laktydu i glikolidu.

Synteza terpolimerów L-LA/GA/o-TMC i L-LA/GA/ɛ-CL

W syntezie terpolimeru L-LA/GA/ε-CL (SCHEMAT 1) jako inicjatora reakcji użyto niskotoksycznego Zr(acac)₄. Stosunek molowy inicjatora do komonomerów wynosił 1:1000 [5.8].

W syntezie terpolimeru L-LA/GA/o-TMC (SCHEMAT 2) zastosowano otrzymany wcześniej oligomer, jako makroinicjator reakcji. Katalizatorem tej reakcji był $Zr(acac)_4$ w tej samej ilości jak w poprzedniej terpolimeryzacji [6,7].

Reakcje prowadzono w szklanym reaktorze przez 72 h, pod poduszką argonu, przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 120°C. Zsyntezowane materiały polimerowe oczyszczano poprzez rozpuszczenie w chloroformie i wytrącanie z metanolu. Oczyszczone terpolimery wstępnie suszono w warunkach normalnych, a następnie w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej do stałej masy. Otrzymano terpolimer o składzie 70% mol L-Laktydylu, 8% glikolidylu i 22% jednostek węglanowych, i o liczbowo średniej masie cząsteczkowej 33 000 g/mol, oraz terpolimer zawierający 81% mol laktydylu, 10% glikolidylu i 9% ε-kaproilu, o liczbowo średniej masie cząsteczkowej 37 000 g/mol.

Formowanie rusztowań komórkowych

Otrzymane terpolimery zostały wykorzystane do formowania porowatych rusztowań komórkowych. Materiały polimerowe rozpuszczono w chloroformie do osiągniecia wymaganej lepkości i dodano przesiane wcześniej kryształki soli NaCl (frakcja 350-450 µm). Otrzymaną lepką masą wypełniono gniazda formy teflonowej. Cylindryczne formy PTFE (średnica 1 cm x długość 15 mm) z mieszaniną suszono przez 24 godziny na powietrzu, a następnie wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 22,5°C (250 mbar ciśnienia) przez 7 dni. Po wysuszeniu z gniazd wydobywano otrzymane kształtki i wypłukiwano porofor poprzez kąpiel w zdemineralizowanej wodzie, przy częstej zmianie kąpieli. Wypłukiwanie poroforu prowadzono do momentu, kiedy przewodnictwo wody wynosiło około 3 µS/cm. Otrzymane rusztowania w postaci walców o średnicy 8 mm i wysokości 10 mm suszono w suszarce próżniowej do stałej masy. Otrzymano rusztowania o bardzo zbliżonej porowatości; rusztowanie wykonane z terpolimeru L-LA/GA/ TMC miało porowatość 84%, zaś wykonane z terpolimeru L-LA/GA/ε-CL - 82%.



Synthesis of terpolymers of L-LA/GA/o-TMC and L-LA/ GA/ε-CL

In the synthesis of the terpolymer L-LA/GA/ ϵ -CL (SCHEME 1) as the initiator reaction low toxity Zr(acac)₄ was used. The molar ratio of the initiator to comonomers was 1: 1000 [5,8].

For the synthesis of L-LA/GA/o-TMC terpolymer (SCHEME 2), oligo-trimethylene carbonate as macroinitiator and catalyst $Zr(acac)_4$ in the same amount as in the previous terpolymerization has been used [6,7].

Reactions were carried out in a glass reactor for 72 h under argon condition with stirring at 120°C. The obtained product was purified by dissolution in chloroform and precipitation in methanol. Purified terpolymers were initially dried under room conditions, and then in a vacuum oven at room temperature to constant weight.

Finally, two terpolymers have been obtained: LP 212 sample - L-LA/GA/o-TMC terpolymer with the average molecular weight 33 000 g/mol and molar composition as follows: 70% L-lactidyl, 8% glicolidyl and 22% TMC units and LW1 sample - L-LA/GA/ε-CL terpolymer with the average molecular weight 37 000 g/mol and molar composition as follows: 81% L-lactidyl, 10% glycolidyl and 9% caproyl units.

The formation of cell scaffolds

Terpolymers [6,7] have been used for forming the porous scaffolds. Samples were dissolved in chloroform to achieve the required viscosity of polymer solution and the NaCl crystals sieved before (fraction 350-450 µm) were added and thoroughly mixed afterwards. The cylindrical forms of PTFE (1 cm diameter x 15 mm length) were filled with prepared mixture and dried for 24 h in the air, then was dried in a reduced pressure at 22.5°C (pressure 250 mbar) for 7 days. After that, scaffolds were removed from the forms and immersed in demineralized water in order to leach out the salt. This process has been repeated several times until water conductivity was close to that of distilled water (3 µS/cm). Finally, after complete salt removal, the samples were dried at ambient temperature and stored in vacuum drier prior to use. The porosity of the obtained scaffolds containing o-TMC and caproyl units was 84 and 82%, respectively.

14 Degradacja rusztowań terpo-••••• limerowych

Rusztowania wykonane z terpolimerów L-LA/GA/ o-TMC i L-LA/GA/ε-CL, po przeprowadzeniu pełnego cyklu pamięci kształtu, po powrocie do kształtu permanentnego, poddano procesowi degradacji hydrolitycznej i enzymatycznej (przy użyciu lipazy trzustkowej). Odważone fragmenty rusztowania (0,1 g) umieszczono w jednakowych naczyniach i zanurzano w 10 ml soli fizjologicznej zawierającej bufor fosforanowy (PBS) o pH = 7,4. Czynność tą prowadzono tak, aby usunąć całkowicie powietrze z porów rusztowań i wypełnić je medium, posługując się strzykawką. W części próbek do roztworu dodawano 1 mg lipazy tworząc trwałą zawiesinę. Degradację prowadzono w temperaturze 37°C, przy lekkim mieszaniu. W ustalonych odstepach czasu poddawano kolejne próbki badaniom,



RYS. 1. Spektrogram ¹H NMR (zakres protonów metinowych i metylenowych) terpolimeru: A) L-laktyd/ glikolid/o-TMC, B) L-laktyd/glikolid/ε-kaprolakton. FIG. 1. ¹H NMR spectra (methine and methylene proton range) of terpolymer; A) L-Lactide/glycolide/ TMC, B) L-Lactide/glycolide/ε-caprolactone.

określając ich zmiany masy, chłonności wody. Każdy wynik uśredniano na podstawie pomiarów 3 niezależnych próbek. Liczono przedział ufności, korzystając z rozkładu prawdopodobieństwa t-Studenta przy poziomie ufności 95%. Analizując widma ¹H NMR terpolimerów (RYS. 1) obserwowano zmiany ich składu z czasem degradacji.

Obliczanie porowatości

Porowatość wyznaczano z pomiarów gęstości terpolimerów, masy i wymiarów każdego z rusztowań zgodnie z normą ASTM D-3574-08. Przyjęto średnią z 5 pomiarów dla każdego z typów rusztowań.

Obliczanie ubytku masy

W celu zbadania postępu degradacji rusztowań komórkowych obliczano ubytek masy na podstawie wzoru (1):

Ubytek masy (%) =
$$\frac{W_0 - W_d}{W_0} \times 100$$
 (1)

gdzie:

W₀ - masa początkowa suchego rusztowania [g],

W_d - masa rusztowania po określonym czasie degradacji i wysuszeniu do stałej masy [g]

Obliczanie chłonności wody

Chłonność wody została obliczona na podstawie wzoru (2):

Chłonność wody (%) =
$$\frac{W_{w} - W_{d}}{W_{w}} \times 100$$
 (2)

gdzie:

W_w - masa po wyjęciu z buforu, po określonym czasie degradacji [g],

W_d - masa po określonym czasie degradacji i wysuszeniu rusztowania do stałej masy [g].

Zarówno ubytek masy jak i chłonność wody były obliczane ze średniej liczbowej dla 3 próbek tego samego rodzaju.

Degradation process of scaffolds The hydrolytic and enzymatic degradation process using pancreatic lipase enzyme was conducted for both types of the scaffolds i.e. L-LA/GA/o-TMC and L-LA/GA/ε-CL, which have been previously subjected to a full shape memory cycle. Weighed samples of each scaffold (0.1 g) were placed in identical vessels, soaked with appropriate medium under a reduced pressure in a syringe in order to remove free air from the pores. For hydrolytic degradation process, the scaffolds were soaked in 10 ml PBS, pH 7.4. In the case of enzymatic degradation, 1 mg of enzyme was added to 10 ml PBS. Degradation process was carried out at 37°C. After selected, specified periods of time the samples were removed, washed and submitted to further investigation. Each result was averaged on the basis of measurements from 3 independent samples. The confidence interval was calculated with the use of t-Student

distribution at a confidence level of 95%. By analysis the ¹H NMR spectra of the terpolymers (FIG. 1) changes of their composition with degradation time was observed.

Calculation of porosity

Porosity was determined based on the density, weight and dimensions measurements of each of the scaffolds in accordance with ASTM D-3574-08 standard. An average of 5 measurements for each type of the scaffolds was taken.

Calculation of weight loss

The weight loss of the scaffolds during degradation process was calculated based on the formula (1):

Weight loss (%) =
$$\frac{W_0 - W_d}{W_0} \times 100$$
 (1)

Where:

W_o - initial dry weight of scaffolds [g]

W_d- dry weight of scaffold after degradation time [g].

Calculation of water absorption

Water absorption was calculated using the formula (2):

Water absorption (%) =
$$\frac{W_w - W_d}{W_w} \times 100$$
 (2)

Where:

 W_{w} - weight of scaffold after removal from the medium after degradation time [g]

W_d - dry weight of scaffold after degradation time [g].

Both weight loss and water absorption was calculated by the averaging of 3 samples of the same kind.

Wyniki i dyskusja

Analiza składu oraz właściwości termicznych terpolimerów podczas procesu degradacji

Wyniki analizy spektrofotometrycznej ¹H NMR oraz chromatograficznej GPC dla terpolimerów L-LA/GA/o-TMC i L-LA/GA/ε-CL, a także wyniki pomiarów termicznych skaningowej kolorymetrii różnicowej DSC w czasie prowadzonej degradacji zestawiono w TABELI 1. Terpolimer L-LA/GA/o-TMC po 24 dniach degradacji hydrolitycznej wykazał wyraźny spadek zawartości jednostek węglanowych TMC, wysoki wzrost zawartości laktydylu LA i nieznaczny spadek sekwencji glikolidylowych GA, co wskazuje na to, że mikrobloki LA, tworzące obszary semikrystaliczne były bardziej oporne na hydrolizę niż pozostałe elementy łańcucha. Spadek zawartości jednostek węglanowych związany jest z degradacją wiązań pomiędzy sekwencjami laktydylowymi lub glikolidylowymi i mikroblokiem węglanowym, co spowodowało jego uwalnianie do medium. W odróżnieniu od tych wyników, w trakcie degradacji z użyciem enzymu, terpolimeru L-LA/GA/o-TMC zaobserwowano jedynie bardzo niewielkie zmiany składu, co świadczy, że mechanizm tej degradacji w dużej mierze nie zależał od rodzaju wiązań estrowych jak i struktury morfologicznej.

W przypadku degradacji hydrolitycznej terpolimeru L-LA/ GA/ε-CL stosunek molowy komonomerów w łańcuchu w początkowym etapie rozkładu był niezmienny w stosunku do próby startowej. Znaczące zmiany obserwuje się dopiero po dłuższym czasie inkubacji w PBS. Dopiero po 112 dniach stwierdzono wzrost zawartości segmentów LA oraz spadek sekwencji GA i ε-CL. W wyniku degradacji enzymatycznej zaobserwowano nieznaczne zmiany w składzie podobnie jak w przypadku degradacji enzymatycznej terpolimeru L-LA/GA/o-TMC.

W czasie degradacji występowały niewielkie zmiany temperatury zeszklenia (T_g) terpolimerów związane ze spadkiem ich masy cząsteczkowej. Na wszystkich termogramach DSC badanych terpolimerów zaobserwowano wyraźne obszary topnienia, świadczące o semikrystaliczności otrzymanych terpolimerów. Wraz z postępem degradacji dla większości badanych próbek zaobserwowano jedynie niewielki jej wzrost. Jedynie w wypadku degradacji hydrolitycznej rusztowania formowanego z terpolimeru zawierającego sekwencje kaproilowe, wzrost ten był znaczny. Ciepło topnienia fazy krystalicznej mikro-bloków laktydylowych w tym wypadku wzrosło z 16,5 J/g do 23,5 J/g (TABELA 1).

Results and Discussions

Analysis of the composition and thermal properties of the terpolymers during degradation process

The results of ¹H NMR, gel permeation chromatography GPC, differential scanning calorimetry DSC of both types of terpolymers during degradation process were collected in TABLE 1. Analysis of molar composition of terpolymer L-LA/ GA/o-TMC after 24 days of hydrolytic degradation revealed decrease in the carbonate units content of TMC, increase in lactidyl and moderate decrease in glycolidyl units. This phenomenon is probably caused by creation of semicrystalline block of LA units resulting in growing resistance against hydrolysis. The decrease in the carbonate units content is related to the cracking of bonds between the lactidyl (or glycolidyl) sequences and carbonate microblock which caused release of TMC oligomers to the medium. During enzymatic degradation of the same type of the scaffold, not significant changes of molar composition have been noticed which indicate that the mechanism of this degradation was not dependent on the type of ester bonds as well as morphological structure.

In the case of hydrolytic degradation of terpolymer of L-LA/GA/ ε -Cl, the molar ratio of comonomers at the beginning of hydrolysis was constant. Significant changes of composition were observed after longer incubation time of the samples in PBS. First drop of caproyl and glycolidyl units with simultaneous increase in lactydoil units were observed after 112 days of hydrolysis. The slow enzymatic degradation mechanism of this scaffold was similar to those containing o-TMC.

During degradation process slight changes in glass transition temperature (T_g) of analysed terpolymers associated with a decrease in their molecular weight were measured. Melting areas at all DSC thermograms of studied terpolymers indicated their semicrystalline character. The heat of melting of the crystalline phase of lactidyl microblocks increased from 16.5 J/g to 23.5 J/g (TABLE 1).

TABELA 1. Zmiany składu terpolimerów w czasie degradacji.

TABLE 1. Changes in the composition of terpolymers during degradation process.

Rodzaj terpolimeru Terpolymer type	Rodzaj degradacji Degradation type	Czas degradacji Degradation time [dni/days]	Stosunek molowy komonomerów w terpolimerze The mole ratio of comonomers in the terpolymer [%]	T _g [⁰C]²	T _m [⁰C]¹	∆H _m [J/g]¹
	Próba wyjściowa Initial sample	0	70/8/22	45.6	76.5	4.7
LP 212 L-LA/GA/o-TMC	Hydrolityczna Hydrolytic	7 24 112	70/9/21 80/8/12 82/6/12	45.6 45.9 41.3	55.4 56.8 55.1	5.2 5.0 5.8
	Enzymatyczna Enzymatic	7 24 112	70/9/21 71/9/20 73/8/19	46.7 46.4 42.5	130.2 56.6 55.4	8.9 5.9 5.7
	Próba wyjściowa Initial sample	0	85/10/5	51.8	135.2	16.5
LW1	Hydrolityczna Hydrolytic	7 20 112	85/10/5 85/10/5 88/8/4	45.9 44.1 43.2	128.4 135.9 133.0	7.4 15.5 23.5
L-LA/GA/CL	Enzymatyczna Enzymatic	7 20 112	86/10/4 85/10/5 88/7/5	50.2 49.3 44.0	134.8 135.9 132.9	10.6 13.3 19.0
11 June/concerneted a DEC (Libian analyzy termination) / Obtained using DEC mathed (Lirup thermal analysis)						

¹Uzyskane metodą DSC (I bieg analizy termicznej) / Obtained using DSC method (I run thermal analysis) ²Uzyskane metodą DSC (II bieg analizy termicznej, po uprzedniej amorfizacji próbki) / Obtained using DSC method (second run of thermal analysis of the sample after an amorphization).

Badanie ubytku masy

Stopień degradacji porowatych rusztowań komórkowych analizowano na podstawie ubytku masy próbek w czasie degradacji. Wyniki przeprowadzonej analizy zostały przedstawione na RYS. 2.

Najwyższy ubytek masy po czasie 112 dni degradacji zaobserwowano dla rusztowań wykonanych terpolimeru L-laktyd/glikolid/ɛ-kaprolakton poddanych degradacji enzymatycznej. Najniższy ubytek masy wykazała próba LP212 uzyskana z terpolimeru L-laktyd/glikolid/o-TMC poddana degradacji hydrolitycznej. W obu przypadkach badanych terpolimerów użycie lipazy spowodowało większy ubytek masy podłoża podczas biodegradacji, niż w przypadku degradacji bez użycia enzymu.



Badanie chłonności wody

Chłonność wody badanych prób przedstawia RYS. 3. Oba rusztowania wykazywały zbliżoną chłonność wody przez cały okres degradacji w zakresie 70-90%. Obliczenia chłonności wody wykazały, iż otrzymane materiały polimerowe charakteryzowały się wysokim stopniem hydrofilowości [9]

Utrzymanie wysokiego stopnia chłonności wody w porowatych podłożach przez cały czas procesu degradacji pozwala na zasiedlenie rusztowań komórkami w warunkach in vitro i gwarantuje, że po zaimplantowaniu do organizmu podłoża zasiedlonego komórkami, dostęp do składników odżywczych będzie na tym samym poziomie na każdym etapie degradacji rusztowania. Wysoka chłonność wody pozwala też na lepszy transport enzymów, w konsekwencji przyspiesza przebieg procesu degradacji.

The study of weight loss of samples

The degree of degradation of the porous scaffolds were analyzed on the basis of the weight loss of the samples during degradation (FIG. 2). The highest weight loss after 112 days, was observed for L-lactide/glycolide/ ε-caprolactone scaffolds incubated in medium with a presence of lipase. The lowest weight loss was noticed for sample LP212 L-lactide/glycolide/o-TMC submitted to hydrolytic degradation. Comparing the rate of weight loss for both terpolymers upon both hydrolytic and enzymatic degradation, the higher weight loss for both samples have been noticed in medium with the enzyme.

RYS. 2. Zmiany ubytku masy skafoldów w czasie degradacji: LW1 (formowany z terpolimeru L-LA/ GA/ε-CL, degradacja hydrolityczna), LW1E (formowany z terpolimeru L-LA/GA/ε-CL, degradacja enzymatyczna), LP212 (formowany z terpolimeru L-LA/GA/o-TMC, degradacja hydrolityczna), LP212E (formowany z terpolimeru L-LA/GA/o-TMC, degradacja enzymatyczna).

FIG. 2. Changes in weight loss of scaffolds during degradation: LW1 (formed from a terpolymer of L-LA/GA/ε-CL, hydrolytic degradation), LW1E (formed from a terpolymer of L-LA/GA/ε-CL, enzymatic degradation), LP212 (formed from terpolymer L-LA/GA/o-TMC, hydrolytic degradation), LP212E (formed from a terpolymer of L-LA/ GA/o-TMC, enzymatic degradation).

Examination of water absorption

Results related to water absorption (WA) of tested samples are presented in FIG. 3. Both types of the scaffolds showed a similar absorption of water throughout the period of degradation. A slightly higher value of water absorption, but within the limits of measurement error, was observed for the sample LP212 (L-LA/GA/o-TMC), which was more than 80%. Water absorption calculations have shown that obtained polymeric materials are characterized by high degree of hydrophilicity [9].

Regardless the scaffolds are degraded in vitro or implanted, maintaining a high degree of water absorption of highly porous samples during entire degradation process allows for full communication and nutrition of cultured cells at the every stage of ongoing degradation. Moreover, such condition kept at the whole volume of matrix allows also for the transport of enzymes responsible for the degradation process of this material.

RYS. 3. Zależność chłonności wody od czasu degradacji dla próbek: LW1 (L-LA/GA/ε-CL, degradacja hydrolityczna), LW1E (L-LA/GA/ε-CL, degradacja enzymatyczna), LP212 (L-LA/GA/ o-TMC, degradacja hydrolityczna), LP212E (L-LA/ GA/o-TMC, degradacja enzymatyczna). FIG. 3. Relationship of water absorption and time of degradation for samples: LW1 (L-LA/GA/ε-CL, hydrolytic degradation), LW1E (L-LA/GA/ε-CL, enzymatic degradation), LP212 (L-LA/GA/o-TMC, hydrolytic degradation), LP212E (L-LA/GA/o-TMC, enzymatic degradation).



100 %

80

100

- LP 212+E

LW1+E

Analiza zmian mas cząsteczkowych dla terpolimeru L-LA/GA/o-TMC i L-LA/GA/CL

Zmiany masy cząsteczkowej, wyznaczone za pomocą metody chromatografii żelowej przedstawiono na RYS. 4.

Spadek liczbowo średnich mas cząsteczkowych zaobserwowano w wypadku badań degradacji obu rusztowań, z tym, że rusztowanie otrzymane z terpolimeru zawierającego ugrupowania kaproilowe cechuje się szybszym spadkiem masy cząsteczkowej w czasie degradacji. Użycie lipazy ma wpływ na zmianę liczbowo średniej masy cząsteczkowej jedynie w wypadku degradacji rusztowania wykonanego z terpolimeru zawierającego mikrobloki węglanowe. Co jest bardzo intersujące, profil degradacji tego materiału ma nieczęsto spotykany charakter. W trakcie pierwszych 2 tygodni degradacji spadek mas cząsteczkowych jest bardzo wolny. zarówno w trakcie degradacji czysto hydrolitycznej, jak i w degradacji z udziałem lipazy. Znaczne przyspieszenie spadku mas cząsteczkowych występuje dopiero po około 30 dniach, w wypadku degradacji enzymatycznej i około 50 dniach degradacji hydrolitycznej.



Obserwacje morfologii porów i ich powierzchni

Powierzchnie porów rusztowań zbadano za pomoca skaningowego mikroskopu elektronowego SEM (RYS. 5 i 6). W trakcie degradacji rusztowań zachodzą zmiany nie tylko w strukturze samego materiału polimerowego, ale również w morfologii powierzchni i budowie porów rusztowań. W rusztowaniach wykonanych z terpolimeru L-LA/GA/ o-TMC wiele porów, pomimo dużych ubytków i silnych zmian powierzchni na wskutek zachodzącej erozji, ma jeszcze w dużej części zachowany kształt pierwotny. Stopień zmian morfologii próbek poddanych degradacji hydrolitycznej jest podobny do próbek, które degradowały w środowisku wodnym zawierającym lipazę. Dopiero szczegółowa analiza powierzchni pozostałych porów tych próbek, przy znacznym powiększeniu obrazu SEM, ujawnia ich bardziej złożoną, porowatą strukturę z obecnością wielu głębokich kawern i kanałów.

Obrazy SEM rusztowań wykonanych z terpolimeru L-LA/ GA/ε-CL wykazują znacznie większe skutki degradacji. Po 112 dniach struktura tego materiału uległa praktycznie całkowitej fragmentacji. W trakcie degradacji prowadzonej w medium zawierającym lipazę występowała znacznie silniejsza erozja powierzchni próbek, w porównaniu do czystej degradacji hydrolitycznej. Świadczą o tym zaobserwowane różnice na zdjęciach mikroskopowych SEM, próbki zdegradowane w obecności lipazy mają powierzchnie bardzo porowatą i znacznie bardziej spękaną.

Molecular weight analysis of samples

A change of the molecular weight of the samples, determined by gel permeation chromatography method is shown in FIG. 4.

The decrease in the number average molecular weight was observed in the case of both degraded scaffolds; however those containing caproyl segments showed higher changes regardless the type of degradation. Only in the case of scaffolds containing o-TMC the use of lipases affect the higher drop in number average molecular weight when compared to hydrolytic degradation of the same sample. It is worth to notice, that the degradation rate of sample L-LA/GA/o-TMC during first two weeks is quite slow showing almost the same behaviour for both enzymatic and hydrolytic degradation. A significant decrease in the molecular weight of the samples with o-TMC in the presence and without lipase occurred after approximately 30 days and 50 days, respectively.

RYS. 4. Zależność zmian masy cząsteczkowej od czasu degradacji dla prób: LW1 (L-LA/GA/ε-CL, degradacja hydrolityczna), LW1E (L-LA/GA/ε-CL, degradacja enzymatyczna), LP212 (L-LA/GA/ o-TMC, degradacja hydrolityczna), LP212E (L-LA/ GA/o-TMC, degradacja enzymatyczna) FIG. 4. The dependence of the molecular weight change from degradation time for samples: LW1 (L-LA/GA/ε-CL, hydrolytic degradation), LW1E (L-LA/GA/ε-CL, enzymatic degradation), LP212E (L-LA/GA/o-TMC, hydrolytic degradation), LP212E (L-LA/GA/o-TMC, enzymatic degradation).

Observation of morphology and surface pores

The surface of the 3-D scaffolds examined using a scanning electron microscope SEM (FIG. 5 and 6).

Scanning electron microscope analysis of the scaffolds has revealed changes of both the structure of the polymeric material as well as the erosion of sample surface.

The scaffolds made from a terpolymer of L-LA/GA/ o-TMC despite the extensive surface erosion of polymer, large weight loss of samples exhibited permanent shape during incubation.

The changes in the morphology of the samples degraded both via hydrolytic and enzymatic mechanism are similar, however detailed analysis of the surface of the remaining porous scaffolds at high magnification of SEM images revealed the presence of many splits and cracks.

SEM images of the scaffolds made from a terpolymer of L-LA/GA/ε-CL showed a significant disintegration of these samples after 112 days. During degradation carried out in a medium containing lipase much stronger erosion of the material resulting in increased porosity and occurring cracks when compared to the samples degraded hydrolytically has been observed.



RYS. 5. Fotografie SEM przekroju rusztowania wykonanego z terpolimeru L-LA/GA/o-TMC: (a) przed degradacją, (b) po 112 dniach degradacji hydrolitycznej, (c) po 112 dniach degradacji enzymatycznej. FIG. 5. SEM cross-sectional images of the scaffold made from a terpolymer of L-LA/GA/o-TMC (a) before degradation, (b) after 112 days of hydrolytic degradation, (c) after 112 days of enzymatic degradation.



RYS. 6. Fotografie SEM przekroju rusztowania wykonanego z terpolimeru L-LA/GA/ε-CL: a) przed degradacją, (b) po 112 dniach degradacji hydrolitycznej, (c) po 112 dniach degradacji enzymatycznej. FIG. 6. SEM cross-sectional images of the scaffold made from a terpolymer of L-LA/GA/ε-CL, a) before degradation, (b) after 112 days of hydrolytic degradation, (c) after 112 days of enzymatic degradation.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że rusztowania komórkowe formowane z terpolimerów L-laktyd/ glikolid/o-trimetylowęglan i L-laktyd/glikolid/ɛ-kaprolakton ulegają degradacji hydrolitycznej *in vitro*, przy wyraźnym wpływie lipazy na jej przyspieszenie. Dodatek enzymu powoduje silniejsze zmiany erozyjne, jakie zachodzą na powierzchni porów rusztowań, co powoduje nieco inne zmiany morfologiczne w trakcie degradacji.

Rusztowanie z terpolimeru L-LA/GA/ε-CL wykazało wyższy ubytek masy podczas degradacji enzymatycznej, niż podłoże z terpolimeru L-LA/GA/o-TMC, zaś przyrost stopnia degradacji w wypadku obecności lipazy w porównaniu do czystej degradacji hydrolitycznej był znacznie większy dla terpolimeru zawierającego mikrobloki węglanowe.

Oba podłoża wykazywały wysoką chłonność wody, niezależnie od stopnia degradacji. Rusztowanie zawierające mikrobloki węglanowe miało bardzo interesujący profil degradacji cechujący się stosunkowo małymi zmianami własności rusztowań, jak i masy cząsteczkowej w trakcie pierwszych 2 tyg. hydrolizy.

Conclusions

Based on the obtained results some conclusion can be drawn from the work. It was found that both terpolymers degraded hydrolytically and the rate of the degradation process was dependent on the presence of an enzyme. The presence of the enzyme facilitates the erosion of scaffold surface. Based on the measurements of sample weight loss, it looks that the scaffold formed with terpolymer containing caproyl units was more susceptible for enzymatic degradation. However the rate of degradation when comparing hydrolytic and enzymatic mechanism is higher for the scaffold with o-TMC. The water absorption was high for both types of scaffolds regardless the time of degradation. From the tissue engineering point of view the slow degradation process of terpolymer L-LA/GA/o-TMC during the first two weeks is very promising because cells have enough time for migration, adhesion and proliferation until the process of degradation is going to start. Moreover, this time allows for the proliferation of cells, transfer their nutrients and metabolites, as well as should affect the vascularization process. The slow degradation of the 3-D scaffolds after the period of about 40-50 days should keep the balance between the rate of growth of the tissue and the degradation time of the scaffold.

Zjawisko to jest bardzo korzystne z punktu widzenia przydatności tych materiałów dla hodowli komórek, powinno przyczynić się do zwiększenia ilości osadzonych na tym podłożu komórek i ich namnażania, do ułatwienia dyfuzji składników odżywczych do osadzonych w porach komórek oraz do przyspieszenia i ułatwienia przebiegu procesu unaczynienia. Powolny rozpad podłoży dopiero po okresie około 40-50 dni powinien również pozwolić na właściwe przerastanie degradującego rusztowania przez tworzącą się tkankę, po implantacji. Stwierdzone wyraźne zwiększenie wpływu enzymu na przebieg degradacji badanych rusztowań w porównaniu do degradacji folii czy grubościennych implantów wykonanych z tego samego typu terpolimerów spowodowane jest znacznie większą powierzchnią właściwą tego materiału [9,10].

Podziękowania

Pracę wykonano w ramach realizacji projektu badawczego NCN 2011/01/B/ST5/06296 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Piśmiennictwo

 Grolik M.M., Fiejdasz S.: Materiały dla inżynierii tkankowej. Majówka Młodych Biomechaników, Ustroń (2008)

[2] Chan B.P., Leog K.W.: Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, Review, Eur Spine J 17(4) (2008) S467-S479.

[3] Kaźnica A., Joachimiak R., Drewa T., Rawo T., Dreszczyński J.: Nowe trendy w inżynierii tkankowej. Artroskopia i Chirurgia Stawów 3 (2007) 11-16.

[4] Albertsson A.C., Eklund M.: Influence of molecular structure on the degradation mechanism of degradable polymers: In vitro degradation of poly(trimethylene carbonate), poly(trimethylene carbonate-co-caprolactone), and poly(adipic anhydride). J. Appl. Polym. Sci. 57 (1995) 87-103.

[5] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with t-Lactide Initiated by Zr(Acac)₄. Macromolecules 34 (2001) 5090-5098.

[6] Smola A., Pastusiak M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Sobota M.: New semicrystalline bioresorbable materials with shape-memory properties. Inżynieria Biomateriałów / Engineering of Biomaterials 89-91 (2009) 82-87. It has been proved the porous scaffolds and their high specific area in the presence of the enzyme make these materials more susceptible to degradation as compared to solid, blown, extruded polymeric materials [9,10].

Acknowledgments

The work was performed within the framework of the research project NCN 2011/01/B/ST5/06296 funded by the National Science Centre.

References

[7] Smola A., Dobrzynski P., Cristea M., Kasperczyk J., Sobota M., Gebarowska K., Janeczek H.: Bioresorbable terpolymers based on L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate with shape memory behaviour. Polymer Chemistry 5 (2014) 2442-2452.

[8] Dobrzynski P.: Synthesis of biodegradable copolymers with low-toxicity zirconium compounds. III. Synthesis and chain-microstructure analysis of terpolymer obtained from L-lactide, glycolide, and ϵ -caprolactone initiated by zirconium(IV) acetylacetonate. J. Polym. Sci. Part. A 40 (2002) 3129-3143.

[9] Hu Y., He Y., Wei J., Fan Z., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., Li S.: Hydrolytic Degradation of Glycolide/L-Lactide/ε–Caprolactone Terpolymers Initiated by Zirconium(IV) Acetylacetonate. J. Appl. Polym. Sci. 103 (2007) 2451-2456.

[10] Jaros A., Gębarowska K., Stojko J., Kasperczyk J., Smola A.: Badania mechanizmu degradacji in vivo terpolimerów z pamięcią kształtu. Inżynieria Biomateriałów / Engineering of Biomaterials 106-108 (2011) 79-84.



20

OSZACOWANIE STABILIZACJI ZŁAMANIA TRZONU KOŚCI UDOWEJ PRZEZ PŁYTKĘ PRZYKOSTNĄ PRZY WYKORZYSTANIU METODY ELEMENTÓW SKOŃCZONYCH

Marek S. Kozień^{1*}, Jacek Lorkowski², Iwona Górka³, Magdalena Kornaga³, Oliwia Grzegorowska⁴, Andrzej Kotela², Ireneusz Kotela²

 ¹ Politechnika Krakowska, Instytut Mechaniki Stosowanej, al. Jana Pawła II 37, 31-864 Kraków
 ² Klinika Ortopedii i Traumatologii Centralnego Szpitala Klinicznego MSW w Warszawie
 ³ Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Nowym Sączu, Instytut Techniczny, ul. Zamenhofa 1a, 33-300 Nowy Sącz
 ⁴ Centrum Rehabilitacyjne "Zdrowie", Kraków

*E-MAIL: KOZIEN@MECH.PK.EDU.PL

Streszczenie

Złamania kości długich mogą być leczone na kilka sposobów. Jednym z nich jest zastosowanie płytki przykostnej. Płytka zamocowywana do kości umożliwia przeprowadzenie leczenia, ale z drugiej strony jest źródłem powstawania dodatkowych naprężeń w obszarach gdzie jest ona przytwierdzona do kości za pomocą śrub. Wartości naprężeń zależą od rozmiaru płytki i śrub, miejsca zamocowań oraz obciążeń zewnętrznych działających na kość. Celem pracy było określenie przemieszczeń kości długiej stabilizowanej implantem przykostnym, szczególnie w rejonie złamania. Z uwagi na wykorzystaną metodę analizy przy okazji oszacowano wartości naprężeń występujących w kości. W oparciu o obrazy radiologiczne trzydziestu leczonych chorych, wykonano analizę obciążeń występujących w przypadku złamań o typie poprzecznym i skośnym. Uzyskano potwierdzenie biomechanicznej stabilności złamania przy stabilizacji nawet czasowej co najmniej sześcioma śrubami. Zwiększenie liczby śrub wpływa korzystnie na stabilizację, szczególnie w przypadku złamań skośnych. Liczba śrub jest jednak ograniczona z uwagi na możliwość zniszczenia struktury kości. Symulacja została przeprowadzona metodą elementów skończonych przy zastosowaniu pakietu komputerowego Ansys. Dla uproszczenia analiz oraz w celu przetestowania możliwości wykorzystania uproszczonego podejścia wykorzystany został model płaski. Możliwość zastosowania takiego modelu w analizach uproszczonych wynika z faktu, że najczęściej śruby mocujące płytkę do kości rozmieszczane są wzdłuż jednej linii w przybliżeniu równoległej do osi kości. Wyniki analiz wskazują, że model płaski wydaje się być wystarczająco dokładny do okołooperacyjnej oceny sposobu stabilizacji złamania, mając na uwadze krótki czas potrzebny do zbudowania modelu.

Słowa kluczowe: złamanie, symulacja komputerowa, kość długa, metoda elementów skończonych, analiza naprężeń

[Inżynieria Biomateriałów 130 (2015) 20-26]

ESTIMATION OF STABILIZATION OF FEMORAL SHAFT FRACTURES BY PARAOSTEAL PLATE USING FINITE ELEMENT METHOD

Marek S. Kozień^{1*}, Jacek Lorkowski², Iwona Górka³, Magdalena Kornaga³, Oliwia Grzegorowska⁴, Andrzej Kotela², Ireneusz Kotela²

 ¹ CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF APPLIED MECHANICS,
 AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKOW, POLAND
 ² CLINICAL DEPARTMENT OF ORTHOPEDICS AND TRAUMATOLOGY, CENTRAL CLINICAL HOSPITAL OF THE MINISTRY OF INTERIOR IN WARSAW, POLAND
 ³ STATE HIGHER VOCATIONAL SCHOOL IN NOWY SACZ, TECHNICAL INSTITUTE,
 UL. ZAMENHOFA 1A, 33-300 NOWY SACZ, POLAND
 ⁴ REHABILITATION CENTRE "ZDROWIE", KRAKOW, POLAND
 *E-MAIL: KOZIEN@MECH.PK.EDU.PL

Abstract

Long bone fractures can be treated in several ways. One of them is using the paraosteal plate. The plate mounted to a bone enables the therapy process, but it can also be a source of extra stresses in the mounting regions. Values of stresses depend on the plates' and screws' dimensions, number of screws, the mounting place and external loads acting on the bone. The aim of this paper was to determine displacements of long bone stabilized by the paraosteal implant, especially in the fracture area. Due to applied method of analysis, the stresses value occurring in the bone were also estimated. Based on radiological images of thirty patients, an analysis of transverse and oblique fractures burthen was performed. The biomechanical fracture stabilization by even temporary stabilization with at least six screws was confirmed. Increasing the number of screws affects profitably the stabilization, especially in the case of oblique fractures. Number of screws is limited by possibility of damage of bone's structure. The simulation was performed using a finite element method and application of the Ansys computer package. In order to simplify the analysis and to test the possibility of reduced attempt application, the plane model was applied. Possibility of application of such a model in simplified analyses is explained by the fact that usually the screws mounting plate to a bone are situated along one line parallel to the line of the bone axis. Results of the analysis show, that the plane model seems to be good enough to preoperative estimation of the way of fracture stabilization due to short time required to creation of the model.

Keywords: fracture, computer simulation, long bone, finite element method, strength analysis

[Engineering of Biomaterials 130 (2015) 20-26]

Wstęp

Złamania kości długich mogą być leczone na kilka sposobów. Jednym z nich jest zastosowanie płyty przykostnej np. Zespol. Do zadań płyty należy przenoszenie obciążeń z odłamu proksymalnego na dystalny i odwrotnie. Płyty powinny być wystarczająco sztywne, aby zapobiec przemieszczeniom odłamów kostnych. Najważniejszym celem zastosowania płyt pozostaje zapewnienie optymalnych warunków do szybkiego i prawidłowego zrostu kostnego [1].

Jedną z powszechnie stosownych metod przybliżonego rozwiązywania problemów mechaniki ciał odkształcalnych, mających szerokie zastosowanie w projektowaniu konstrukcji jest metoda elementów skończonych - MES [2,3]. W ostatnich dziesiątkach lat coraz częściej metodę tę stosuje się do symulacji zagadnień szeroko rozumianej biomechaniki, w tym analiz wytrzymałościowych pojedynczych kości, stawów [4-10], segmentów kręgosłupa [11], zębów wraz z wypełnieniami [4]. Autorzy stosowali wcześniej MES do symulacji odkształceń kości strzałkowej i piszczelowej przy ich leczeniu [6,7] oraz do wyznaczania naprężeń w rzepce [12]. Zasadniczym problemem analiz ilościowych metody do analiz wytrzymałościowych kości jest opis własności materiału, z jakiego zbudowana jest kość. Materiał ten cechuje się niejednorodnością i zwykle nieizotropowością (w szczególności brakiem ortotropii). Dla przypadku kości długich wiąże się to z budową wewnętrzną w postaci nieregularnych beleczek kostnych, które jednak w skali makro tworzą określone łuki najczęściej wzdłuż linii kierunków naprężeń głównych (np. łuki gotyckie w obrebie końca bliższego kości udowej). Ponadto warstwa korowa kości ma inną budowę i własności mechaniczne. Powoduje to trudność w wyodrębnieniu tak zwanego reprezentatywnego elementu objętościowego (RVE), a w spojrzeniu szerszym trudność w homogenizacji materiału kości. Mimo wspomnianych ograniczeń od wielu lat dokonywane są próby symulacji odpowiedzi kości długich na obciążenia zewnętrzne przy zastosowaniu modeli wytrzymałości materiałów, a szerzej mechaniki ciał odkształcalnych. W tym celu budowane są modele MES zarówno o charakterze płaskim jak i przestrzennym.

Celem pracy jest określenie przemieszczeń kości długiej stabilizowanej implantem przykostnym, szczególnie w rejonie złamania, przy zastosowaniu różnej liczby śrub mocujących oraz doborze najlepszego rozwiązania możliwego do zastosowania w procesie leczenia.

Materiał i metodyka

W oparciu o obrazy radiologiczne reprezentatywnej grupy trzydziestu chorych, wykonane w projekcji przednio-tylnej uzyskano wzorcowy model przekroju czołowego kości udowej, przechodzący przez środek głowy kości udowej.

Rozważono przypadki złamania o typie skośnym (dwa przypadki różniące się kątem złamania tj. 30°, 45°) i złamania poprzecznego (0°). Zastosowano analizę MES typu płaskiego, jako jeden z przekrojów kości wybierając przekrój czołowy kości udowej. Symulacje wykonano przy wykorzystaniu pakietu komputerowego *Ansys*.

Aby dokonać dokładnej analizy odkształceń i naprężeń występujących podczas leczenia badanych złamań należało zbudować przestrzenny model kości udowej i na jego podstawie wykonać poszczególne symulacje. W celu przetestowania modelu uproszczonego oraz mając na uwadze charakter wstępny analizy wpływu zastosowanego implantu, a w szczególności sposobu jego zamocowania do kości, w prezentowanej pracy rozważono jedynie analizę przeprowadzoną dla przekroju czołowego kości przy zastosowaniu modelu płaskiego układu. Model MES kości wraz z płytką stabilizującą oraz sposób zamodelowania złamań przedstawiono na RYS. 1.

Introduction

Long bone fractures can be treated in several ways. One of them is using the paraosteal plate, e.g. Zespol. The plate's task is to transfer the load from proximal to distal fraction and vice versa. Plates should be inflexible enough to prevent fraction displacements. The most important purpose of using it, is to ensure optimal conditions for rapid and proper bone healing [1].

One of the commonly used methods of approximate strength problem solving in solid mechanics, having wide application in the design of the structure is a finite element method (FEM) [2,3]. In recent decades more and more often it has been used to simulate issues of broad understood biomechanics, including strength analysis of single bones, joints [4-10], spine segments [11], teeth with fillings [4]. A FEM method was earlier used by authors to simulate fibula and tibia deformations during treatment [6,7] and to set down the stress in kneecap [12]. The main quantitative analysis problem of the method used to bone strength analysis, is a material properties description, of which the bone is built. This material is non-homogeneous and usually anisotropic (especially non-orthotropic). In the case of long bones it is connected with the internal structure in the form of irregular trabeculae, which, however, in the macro scale create defined arches. Most frequently along the line of the main stress directions (e.g. gothic arches within the proximal femur). Moreover, the bone cortical layer has different structure and mechanical properties. It results in difficulties to identify the so called representative volume element (RVE), and, in the wider look, also a difficulty in homogenizing the bone material. Despite mentioned limitations, for many years, attempts have been made to simulate the response of the long bones to external loads using models of material strength, and wider - solid mechanics. In order to achieve this goal, both kinds of FEM model are built: plane or volume.

The aim of this study is to determine displacement of the long bone stabilized by the paraosteal implant, especially in the region of fracture, using different amounts of fixing screws and choosing the best solution that would be possible to use in the treatment process.

Methods

Based on radiological images of thirty representative patients, that were made in the anterior-posterior projection, the reference model of the femur frontal section view, passing through the centre of femoral head, was made.

Cases of oblique fractures (two different cases for fractures: 30° , 45°) and transverse fracture (0°) were concerned. A plane FEM analysis was used, choosing the femur frontal section as one of the bone sections. Simulations using computer package Ansys were performed.

To make an exact deformation and stress analysis, which occur during fracture treatment, a three-dimensional femur model was built, to perform particular simulations on its basis. In order to simplify the analysis and to test the possibility of reduced attempt application, only the frontal section of the bone analysis using plane FEM was considered in presented analysis. The nature of initial impact of implant used, especially its attachment to the bone were analysed. The model of the bone with paraosteal plate and form of modelling of fractures are presented in FIG. 1.



RYS. 1. Model MES kości udowej wraz ze stabilizatorem dla złamania prostego (a), skośnego pod kątem 30° (b) i skośnego pod kątem 45° (c). FIG. 1. FEM model of a bone with mounted plate stabilizer for different types of fractures: transverse (0°) – (a),

oblique $(30^\circ) - (b)$ and oblique $(45^\circ) - (c)$.

Z uwagi na przyjęty model płaski założono, że śruby mocujące płytkę stabilizującą położone są w płaszczyźnie przekroju kości. Możliwość zastosowania takiego modelu w analizach uproszczonych wynika z faktu, że najczęściej śruby mocujące płytkę do kości rozmieszczane są wzdłuż jednej linii w przybliżeniu równoległej do osi kości. Ponadto przyjęto, że śruby tworzą integralną całość zarówno z kością w obszarze kontaktu (z uwagi na gwint) jak też i z płytką w obszarze kontaktu (z uwagi na dopasowanie średnicy otworów i śruby w trakcie przygotowywania płytki do montażu). Założono też, że obszar kontaktu pomiędzy płytką a kością jest swobodny, co oznacza że nie wprowadzono w modelu MES elementów kontaktowych, a w praktyce, że całe obciążenie w miejscu złamania przenoszone jest przez płytkę wraz ze śrubami.

Obciążenie kości w stawie biodrowym zamodelowano poprzez wprowadzenie sił zewnętrznych o charakterze statycznym działających na wybranym fragmencie osi o kierunku pionowym modelującym obciążenie analogiczne do standardowego ciężaru człowieka bądź o kierunku pionowym modelującym obciążenie równe ciężarowi człowieka z dodatkowymi siłami działającymi w płaszczyźnie czołowej w kierunku dobocznym bądź doprzyśrodkowym (RYS. 2a) w wyniku przeciążenia zewnętrznego. Sposób podparcia kości w stawie kolanowym zamodelowano poprzez zablokowanie przemieszczeń na wybranym fragmencie osi (RYS. 2b).

Do analiz wzięto kość udową o długości 700 mm. Materiał kości zamodelowano jako jednorodny i izotropowy o własnościach: E = 15 GPa, v = 0,29. Kość stabilizowana jest przez stalową płytkę o grubości 9 mm i długości zmiennej w zakresie od 100 mm do 150 mm w zależności od liczby i ustawienia śrub mocujących daną płytkę. Średnica każdej ze śrub wynosi 3,5 mm, ich długość dobrana jest do średnicy kości. Odległość płytki od kości wynosi 5 mm. Due to used plane model it was assumed that the screws mounting the paraosteal plate are situated in the plane of the cross-section of the bone. Possibility of application of such model in simplified analyses is explained by the fact that usually the screws mounting plate to a bone are situated along one line parallel to the line of the bone axis. Moreover it was assumed that the screws are integral with a bone in region of contact (due to thread) and with a plate in region of contact (due do matching of the diameters of holes and diameter of screws during individual preparing of the plate to its mounting). Moreover, it was assumed that contact between plate and bone is free. It means that no contact FEM elements were used. It means that in practice the whole loading in place of fracture are acting on plate with screws.

The load of the bone in the hip joint was modelled by inserting static external forces, operating on the selected axis fragment of the vertical direction. This approach enabled the load modeling by analogy to the standard weight of the man (FIG. 2 a). We have also used the vertical direction, modeling the load equal to the standard weight of the man with additional forces acting in the frontal plane lateral and medial as a result of external overload. The way of the bone support in the knee joint was modelled by blocking the displacements on the selected fragment of the axis (FIG. 2 b).

A 700 mm long femur was taken to the analysis. The bone material was modelled as homogeneous and isotropic with the following properties: E = 15 GPa, v = 0.29. The bone is stabilized by a 9 mm thick steel plate, which length ranging from 100 mm to 150 mm, depending on the amount and setting of screws, which were used for plate fixation. The diameter of each screw is 3.5 mm, their length is fitted to the diameter of the bone. The distance to the bone is 5 mm.



RYS. 2. Model MES obciążenia zewnętrznego (a) i warunków brzegowych (b). FIG. 2. FEM models of external loadings (a) and boundary conditions (b).

Przyjęto, że stabilizatory i śruby wykonane są z jednorodnej i izotropowej stali o własnościach: E = 210 GPa, v = 0,29. Obliczenia zostały wykonane przy zastosowaniu pakietu komputerowego metody elementów skończonych Ansys. Struktury były zamodelowane przy wykorzystaniu dwuwy-miarowych elementów strukturalnych plane42 pracujących w zakresie płaskiego stanu naprężeń.

Złamanie proste kości zamodelowano w postaci przerwy w materiale kości o szerokości 3 mm. Założono, istnienie przerwania ciągłości struktury kości oraz niewielkich jej ubytków. Tak duża wartość odległości spowodowana była częstym brakiem drobnych fragmentów kostnych korelującym z brakiem zastosowania elementów skończonych typu kontaktowego w tym obszarze i konieczności spełnienia warunku nie zachodzenia na siebie analizowanych obszarów wskutek odkształcenia kości. Analogicznie zamodelowano złamanie skośne o kącie nachylenia szczeliny złamania 30° i 45°. Rozważono obciążenie pionowe o całkowitej wartości 500 N oraz obciążenie poziome o całkowitej wartości 500 N, działające alternatywnie dobocznie i doprzyśrodkowo w płaszczyźnie czołowej. Rozważono przypadki stabilizacji z użyciem 2 - 8 śrub.

Wyniki

Przeprowadzone symulacje dla złamania poprzecznego oraz złamań skośnych prowadzą do następujących obserwacji. W przypadku złamań poprzecznych lub skośnych o kącie nachylenia szczeliny złamania 30° przy zastosowaniu 4 lub więcej śrub największe przemieszczenia względne fragmentów złamanej kości pojawiają się przy obciążaniu jednobiegunowo. Zmniejszenie ilości śrub zwiększa przemieszczenia względne. Jedna śruba umocowana w danym odłamie kości, nie jest w stanie utrzymać w stabilnym położeniu odłamów kostnych, nawet czasowo. Zwiększenie liczby śrub ma korzystny wpływ również na oszacowany rozkład naprężeń i utrzymanie stabilności w całym układzie, tworzonym przez kość i płytkę ze śrubami. Podczas zastosowania co najmniej 6 śrub rozkład naprężeń układa się podobnie przy złamaniach poprzecznych i skośnych 30° i 45°. Zastosowanie większej liczby śrub ma korzystny wpływ na równomierny rozkład naprężeń. Na RYS. 3 pokazano przykładową mapę sumy przemieszczeń (a) oraz naprężeń zastępczych von Misesa (b) w przypadku złamania skośnego o kącie 45° i użycia stabilizatora o sześciu śrubach dla kości obciążonej jedynie siłą pionową o wartości 500 N. Dokonane symulacje pokazują, że na zachowanie układu poza obciążeniami pionowymi, mają również wpływ siły działające w płaszczyźnie poziomej.

It was assumed, that the stabilizers and screws were made of homogeneous and isotropic steel with properties: E = 210 GPa, v = 0.29. Analyses were performed by application of the finite element package Ansys. The structures were modelled by 2D structural solid element plane42 with the option of the plane stress analysis.

23

The simple bone fracture was modelled as a 3 mm wide gap in the bone material. An existence of the bone structure disruptions and small cavities were assumed. Such a large distance value was caused by a frequent lack of small bone fragments correlated with the lack of application of the contact type finite elements in this area, and also the necessity to meet the condition of no overlapping analyzed areas as a bones' deformation result. Similarly, oblique fractures of the fracture gap angle of 30° and 45° were modelled. A total vertical load of 500 N and a total horizontal load of 50 N acting alternatively lateral and medial in the frontal section were considered, as well as stabilization cases with 2 - 8 screws.

Results

Simulations that were made for the transverse and oblique fractures lead to the following observations. In the case of transverse or oblique fractures with the fracture gap angle of 30°, by using four or more screws, the higher relative displacements of the bone's parts appears with unipolar loading. Reducing the number of screws increases the relative displacements. One screw fastened in one particular bone fragment is not able to maintain stable position of the bone fragments, even temporarily. The increasing number of screws has a beneficial effect on the estimated stress distribution and stability in the whole system, formed by the bone and the plate with screws. By using at least 6 screws, the stress distribution is similar in both: transverse and oblique fractures 30° and 45°. The application of higher number of screws has a beneficial effect on the homogeneous stress distribution. In FIG. 3 there were shown exemplary map sum of displacements (a) and equivalent von Mises stress (b) for the case of oblique fracture with the fracture gap angle of 45°, using the plate with six screws and for bone loaded only by vertical force of 500 N. The simulation shows that the behaviour of the system beyond the vertical loads, is also influenced by the forces acting in horizontal plane.



RYS. 3. Mapa wartości przemieszczeń (a) i naprężeń zastępczych von Misesa przy symulacji złamania ukośnego pod kątem 45° (b), przy użyciu stabilizatora o sześciu śrubach i obciążeniu jedynie siłą pionową o całkowitej wartości 500 N.

FIG. 3. Maps of displacements (a) and equivalent von Mises stress (b) for oblique fracture (45°), stabilizer with six screws and bone loaded by vertical force of 500 N.



RYS. 4. Mapa wartości przemieszczeń przy symulacji złamania ukośnego pod kątem 45°, przy użyciu stabilizatora o sześciu śrubach i obciążeniu siłą pionową o całkowitej wartości 500 N oraz siłą poziomą o całkowitej wartości 50 N działającą w lewo (a) i w prawo (b).

FIG. 4. Maps of displacements for oblique fracture (45°), stabilizer with six screws, bone loaded by vertical force of 500 N and horizontal force of 50 N acting to left (a) and to right (b).

Zwrot takich sił ma istotne znaczenie na rozkład napreżeń na płytce. Siły zwrócone zgodnie ze zwrotem osi x, w stronę pionowej osi ciała, maja niekorzystny wpływ na układ obciażeń, a więc i proces leczenia. Siły takie powodują, że zastosowany implant nie jest w stanie utrzymać części złamanej kości bez niekorzystnych odkształceń w obszarze złamania. Górny odłam złamanej kości, nakłada się na dolny, przy przyjętych typach elementów skończonych. Oznacza to w praktyce powstanie dodatkowych naprężeń w obszarze złamania. Natomiast niewielkie siły zwrócone odwrotnie na osi x, nie mają tak negatywnego wpływu na interakcje w obrębie zespolenia i szczeliny złamania. Na RYS. 4 pokazano wpływ działania sił obciążenia poziomego na przemieszczenia kości w postaci mapy sumy przemieszczeń. Pokazano przypadek złamania skośnego o kącie 45°, użycia stabilizatora o sześciu śrubach dla kości obciążonej siłą pionową o wartości 500 N oraz siłą o wartości 50 N działającą poziomo alternatywnie w dwóch kierunkach. Mapy te warto porównać z RYS. 3a, na którym przestawiono te same mapy dla przypadku bez obciążenia poziomego.

The turn of such forces is important to stress distribution on the plate. Forces turned in accordance with the turn of x-axis, towards the vertical body axis, have an adverse effect on the load system, and thus the healing process. Such forces cause, that the implant used, is not able to maintain the part of broken bone without adverse deformations in the fracture. The superior fragment of the broken bone overlaps the inferior one by established types of finite elements. In practice it means, that additional stresses in the fracture occur. In contrast, the opposite small forces on the x-axis do not have such negative influence on an interaction of the fusion and the fracture gap. In FIG. 4 the influence of the horizontal force on bone's displacements in the form of map sum of displacements was shown. It were shown the two cases of oblique fracture with the fracture gap angle of 45°, using plate with six screws loaded by vertical force of 500 N and horizontal force acting separately in two directions. The maps may be compared with this from FIG. 3a obtained for the case without horizontal load.

Dyskusja

Metoda elementów skończonych jest powszechnie stosowaną metodą we współczesnej mechanice ciał odkształcalnych. Służy ona do znajdowania rozwiązań przybliżonych - lecz wystarczająco dokładnych – zagadnień w wytrzymałości materiałów [2,3]. W celu zbudowania poprawnego modelu odpowiednie założenia dotyczące:

 - typu modelu ciała odkształcalnego (typu zastosowanego elementu skończonego),

stosowanego opisu materiału (równania konstytutywne),
 zamodelowania sposobów podparcia elementów (warunki brzegowe),

 zamodelowania obciążeń zewnętrznych muszą być zdefiniowane i zastosowane.

Pozwala to na przeprowadzenie analizy wytrzymałościowej wybranego elementu strukturalnego, w szczególności układu kość/staw.

Zasadniczym ograniczeniem w zastosowaniu MES do analiz o charakterze ilościowym jest trudność zamodelowania własności mechanicznych kości (niejednorodność, brak izotropii). Kolejną trudnością jest uogólnione (nieosobnicze) zamodelowanie geometrii kości w ujęciu przestrzennym wraz z zamodelowaniem warunków brzegowych (interakcji z sąsiednimi kośćmi w stawach) oraz zamodelowania obciążeń zewnętrznych, również o charakterze incydentalnym.

W oparciu o przedstawione analizy można stwierdzić, że bazując na metodzie elementów skończonych możliwe jest zbudowanie prostego, lecz wystarczająco dokładnego z punktu widzenia stawianego celu, dwuwymiarowego (płaskiego) modelu kości udowej (w odróżnieniu od powszechnie stosowanych obecnie modeli trójwymiarowych, których utworzenie wymaga czasu, a precyzja modelowania nie jest oczywista z uwagi ma modelowanie kształtów, własności materiałowych i warunków brzegowych). Wyniki analiz pozwalają na określenie przemieszczeń (i pomocniczo naprężeń) występujących w płytce i śrubach mocujących, a przede wszystkim w rejonie złamania.

Rezultaty analiz wskazują na istotne znaczenie liczby zastosowanych śrub mocujących. W przypadku zamocowania płytki stalowej na dwóch śrubach kość ulega z jednej strony większemu rozwarciu, a w kości występują koncentracje naprężeń blisko rejonu złamania. W przypadku zwiększenia liczby śrub przemieszczenia względne fragmentów złamanej kości zmniejszają się. Już przy mocowaniu przy wykorzystaniu czerech śrubach widać, że obciążenia przenoszone są bardziej przez płytkę i zmniejsza się rozwarcie złamania. Najbardziej optymalnym z tego punktu widzenia rozwiązaniem jest zastosowanie płytki zamocowanej przy użyciu sześciu śrub. Dalsze zwiększanie liczby śrub jest jednak ograniczone z uwagi na naruszenie struktury kości.

W niniejszej pracy ograniczono się do zastosowania modelu płaskiego. Model ten może być rozszerzony na model przestrzenny, co zwiększyłoby dokładność analizy w sensie ilościowym. Rozszerzeniem analiz może być również wziecie pod uwage stabilizatora o innych rozmiarach, bądź mocowanego przy zastosowaniu śrub o innych średnicach, rozmieszczonych inaczej niż wzdłuż jednej linii, bądź wykonanych z innego materiału. Można również zasymulować inne rodzaje i wartości obciążeń. W dokładniejszych analizach o charakterze ilościowym należałby również zwrócić uwagę na modelowanie materiału kości oraz postać hipotezy wyteżeniowej [4,13]. Zastosowanie modelu płaskiego pomimo wątpliwości przedstawianych w literaturze wydaje się sensowne z punktu widzenia klinicznego, pozwala bowiem na szybką okołooperacyjną analizę i stworzenie modelu działania chirurgicznego.

Discussion

The finite element method is commonly used in contemporary applied solid mechanics. The method is sufficiently accurate to approximate, strength analysis of materials [2,3]. For building appropriate model the suitable assumptions concerning:

- type of applied model of solid body (type of used finite element),

- adequate description of the material (constitutive equations),

- the element support modelling (boundary conditions),

 modelling the external loads must be defined and applied. It allows to make the chosen structural element strength analysis, in particular the bone/anastomosis system.

The fundamental limitation in using FEM for quantitative analysis is the difficulty in mechanical bone properties modelling (non-homogeneity, anisotropy). Another difficulty is the general (not individual) modelling of the three dimensional bone geometry, including boundary conditions (interactions with next bones in joints) and modelling the external loads, also with incidental nature.

Based on presented analysis, it can be concluded, that it is possible to create a simple, but good enough from the formulated aim, plane finite element model of femur bone (alternate to commonly used three dimensional ones, which building is time consuming and the obtained precision of modelling is not obvious due to problems with modelling of shapes, material properties and boundary condition). The results can be helpful to determine displacements (and by the occasion stresses) occurring in the plate and fixing screws materials, and mainly in region of bone fracture.

The results indicate the importance of the number of fixing screws. In the case of fixing the steel plate using two screws, the bone becomes more divergent on one side, and there is a stress concentration near the fracture area. When more screws are used, relative displacements of parts of fractured bone decreases. By using only four screws it can be seen, that the load is transferred more by the plate and the opening of fracture fissure decreases. The most optimal seems to be the use of the plate fixed by six screws. Higher number of screws are limited by possibility of damage of bone's structure.

The presented work is limited to the plane model. It can be extended to the three-dimensional model, which would increase the analysis precision in quantitative meaning. A stabilizer with different diameters, fixed with different diameters screws, located in the other way than along one line and made of different material, could also be taken into consideration as an analysis extension. Other types and values of the loads can be simulated. In more detailed quantitative analysis also bone material modelling and form of the equivalent stress should be taken into account [4,13]. Using the plane model, despite doubts presented in the literature, seems to make sense from the clinical point of view, as it allows quick perioperative analysis and creating the model of surgical action.

Działające na względnie długich dźwigniach mięśnie, w przypadku złamań kości długich powodują nadmierne obciążenia, których wielkości przekraczają wytrzymałość mechaniczną układu stabilizator - kości. Rodzaj złamania, jego postać i charakter zależą od wielu czynników, analogicznie wytrzymałość struktury biomechanicznej powstałej w wyniku stabilizacji złamania. Decydujące znaczenie ma rodzaj, kierunek i wielkość działających sił. Ewentualne powtórne uszkodzenie kości bądź zespolenia zależy również od stanu układu kostnego, związanego z wiekiem i zdrowiem człowieka. W okresie rozwojowym pojawiają się złamania podokostnowe typu zielonej gałązki. Są to złamania bardziej stabilne, z dodatkowym "stabilizatorem wewnętrznym" jakim jest okostna. Natomiast u osób starszych złamania osteoporotyczne wieloodłamowe nie mają tego typu dodatkowej stabilizacji [14]. Nakłada się na to inny metabolizm kości.

Z wytrzymałościowego punktu widzenia można postawić zagadnienie doboru wielkości stabilizatora oraz liczby i średnicy zastosowanych śrub mocujących. Zwykle dobór ten dokonywany jest przez lekarza mając na względzie jego doświadczenie kliniczne, rodzaj złamania oraz wielkość kości. W niniejszej pracy dokonano symulacji interakcji stabilizatora ze złamaną kością, mając na uwadze różną liczbę zastosowanych śrub mocujących, z punktu widzenia stabilizacji złamania, określając powstałe przemieszczenia przy wybranych obciążeniach zewnętrznych kości w zakresie statycznym.

Wniosek

Płaski model MES wydaje się być korzystnym do okołooperacyjnej oceny sposobu stabilizacji złamania. Jego zastosowanie jest zalecane i uzasadnione w niektórych przypadkach leczenia przez krótki czas wymagany do jego powstania. Muscles acting on relatively long levers, in the case of long bone fractures create excessive stresses, which size exceeds the mechanical strength of the stabilizer, which is the bone structure. The fracture type, its form and feature depend on many factors, and so does the strength of biomechanical structure resulting from the stabilization of the fracture. The type, direction and size of acting forces are critical. Possible second bone or anastomosis damage depend on the state of skeletal system, connected with the age and health of the man. In the juvenility greenstick fractures appear. Subperiosteal fractures are more stable, with an additional, internal stabilizer, which is periosteum. In contrast, osteoporotic fractures leading to multiple fractures in elderly people, do not have this type of additional stabilization [14]. It is due to a different metabolism in the bones.

From the point of view of the strength, an issue of the stabilizer's size selection and the fixing screws diameter can be raised. This selection is usually made by the doctor, taking into consideration his/her experience, type of the fracture and the size of the bone. In this research the simulation of interaction between stabilizer and bone was made, taking into account different number of screws, from the point of view of stabilization effect, determining simulated displacements by chosen external loads of the bone in a static range.

Conclusion

The plane FEM model seems to be favourable to perioperative estimation of fracture stabilization way. Its application is justified and recommended in some cases by short time required to create the model.

Piśmiennictwo

 Będziński R.: Biomechanika inżynierska. Zagadnienia wybrane. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław (1997).
 Zienkiewicz O.C.: Introductory Lectures on the Finite Element Method, CISM Lectures and Courses - No. 130. Springer, Wien-New York (1982).

[3] Zienkiewicz O.C., Taylor R.L., Zhu J.Z.: The Finite Element Method - its Basis and Fundamentals. Butterworth-Heinemann Elsevier. Oxford (2013).

[4] Będziński R. (Ed.) Mechanika Techniczna t. XII. Biomechanika. Instytut Podstawowych Problemów Techniki. Warszawa (2011).

[5] Keyak J.H., Rossi S.A., Jones K.A., Skinder H.B.: Prediction of femoral fracture load using automated finite element modeling. Journal of Biomechanics 31 (1998) 125-133.

[6] Kozień M.S., Lorkowski J., Szczurek S., Hładki W., Trybus M.: Komputerowa symulacja izolowanego rozejścia więzozrostu strzałkowo-piszczelowego metodą elementów skończonych. Przegląd Lekarski 65(1) (2008) 50-53.

[7] Kozień M.S., Lorkowski J.: Application of the finite element method to deformation and stress analysis of tibia and fibulla with one side blocked growth plate. Annals of Anatomy (2006) 188.

References

[8] Lotz J.C., Cheal E.J., Hayes W.C.: Fracture prediction for the proximal femur using finite element method. Part I - linear analysis. Part II – nonlinear analysis. Journal of Biomechanical Engineering 113 (1991) 353-365.

[9] Prendergast P.J.: Finite element models in tissue mechanics and orthopeadic implant design. Clinical Biomechanics 12 (1997) 343-366.

[10] Reitbergen B., Huiskes R., Eckstein F., Ruegsegger P.: Trabecular bone tissue in the healthy and osteoporotic human femur. Journal of Bone and Mineral Research 18 (2003) 1781-1788.
[11] Wolański W., Tejszerska D.: Analiza biomechaniczna odcinka szyjnego kręgosłupa człowieka w sytuacji zastosowania stabilizacji. Modelowanie Inżynierskie 38 (2009) 295-300.

[12] Kozień M.S., Lorkowski J., Pałka W.: Strength Analysis of Human Patella. Biocybernetics and Biomedical Engineering 26(3) (2006) 77-83.

[13] Milewski G.: Strenth hyphotheses for hard tissues of teeth.
Acta of Bioengineering and Biomechanics. 4(1) (2002) 803-804.
[14] Błaszczyk J.W.: Biomechanika kliniczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (1998).

LIPOSOMY JAKO NOŚNIKI SUBSTANCJI AKTYWNYCH PRZENOSZONYCH W GŁĄB SKÓRY

URSZULA GOIK^{1*}, IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA², AGATA PIETRZYCKA³

¹ Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 31-149 Kraków
² Małopolska Wyższa Szkoła im. Józefa Dietla w Krakowie, Wydziału Nauk o Zdrowiu, ul. Rynek Główny 34, 31-010 Kraków
³ Zakład Cytobiologii, Katedra Farmakobiologii, Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
*E-mail: u.goik@ur.krakow.pl

Streszczenie

Od bardzo dawna skóra jest miejscem aplikacji kosmetyków i leków dermatologicznych. Obecnie można zauważyć coraz większe zainteresowanie preparatami aplikowanymi na skórę w celu leczenia, czy uzyskania dobrego efektu kosmetycznego. Działanie leków podawanych na powierzchnię skóry nie ogranicza się tylko do jej obszarów, ale dzięki wchłanianiu substancji leczniczych przez nią lek może dotrzeć do głębiej położonych tkanek lub do krwiobiegu. Podobnie preparaty kosmetyczne mogą działać w obrębie warstw naskórka jak również skóry właściwej oraz przedostawać się do krwiobiegu. Liposomy są to pęcherzyki, które otoczone są podwójną warstwą lipidową. Powstają one samoistnie z fosfolipidów w środowisku wodnym i są wypełnione niewielką ilością roztworu wodnego, z którego powstają. Posiadają wiele pozytywnych właściwości na przykład: mogą przenosić zarówno wodę jak i rozpuszczalne w lipidach leki, mogą zawierać micro i makro molekuły, zapewniają długotrwałe uwalnianie i ukierunkowane dostarczanie leku oraz docelowe dostarczenie leku w środowisku nieprzyjaznym, stabilizują biodegradowalne leki i związki aktywne zapewniając ochronę przed utlenianiem, poprawiają stabilizację protein i mogą być aplikowane do organizmu poprzez wiele dróg dostarczania. Liposomy znalazły swoje zastosowanie w wielu dziedzinach, takich jak biotechnologia, mikrobiologia oraz w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym i spożywczym. Ponadto osiągnięcia nanomedycyny są przełomowe w przenoszeniu leków, a wszechstronność liposomów spowodowała wzrost ich użycia w wielu dziedzinach medycyny, takich jak diagnoza i terapia.

Słowa kluczowe: liposomy, stratum corneum, dyfuzja przezskórna

[Inżynieria Biomateriałów 130 (2015) 27-39]

LIPOSOMES AS CARRIERS FOR THE DELIVERY OF ACTIVE SUBSTANCES TO THE SKIN

URSZULA GOIK^{1*}, IZABELA ZAŁĘSKA-ŻYŁKA², AGATA PIETRZYCKA³

¹ Faculty of Food Technology, University of Agriculture in Krakow
ul. Balicka 122, 31-149 Krakow, Poland
² Faculty of Health Sciences, Jozef Dietl Malopolska Higher School in Krakow, Poland
³ Cytobiology Department of Pharmacobiology Chair, Medical College of Jagiellonian University,
ul. Medyczna 9, 30-688 Krakow, Poland
*E-mail: U.goik@ur.krakow.pl

Abstract

Since ancient times cosmetics and dermatological medicines have been applied to the skin. Presently growing interest in topical administration in order to achieve therapeutic or good cosmetic effects can be noticed. Effectiveness of medicines topically applied is not limited only to the skin, but due to the absorption of medical substances, the drug can reach subdermal tissues or circulatory system. Similarly, active substances in cosmetic can act both within epidermis and dermis layers, and can enter the bloodstream. Liposomes are vesicles which are surrounded by a lipid bilayer. They are created spontaneously from phospholipids in aqueous environment and they are filled with a small amount of aqueous solution of hydrophilic active substances. Incorporation of micro and macro molecules in liposomes provides stabilization, constant release during the time unit and targeted drug delivery in hostile environment. Biodegradable drugs protected from oxidation improve protein stabilization and can be administered through various routes. Liposomes are used in numerous applications, including cosmetics and biotechnology, microbiology, and also pharmaceutical and food industry. Moreover, nanomedicine developments are crucial for carrying drugs, and liposomes versatility leads to increase in their application in medical fields, like diagnosis and therapy.

Keywords: liposome, stratum corneum, transdermal diffusion

[Engineering of Biomaterials 130 (2015) 27-39]

Introduction

Skin as an application area of cosmetic and therapy preparations

The skin, essentially its outermost layer (*stratum corneum*), protects underlying tissue from dehydration, mechanical and chemical stress, viral, bacterial and fungal infections, and UV radiation. The skin is the largest organ of the human body, with the area of up to 2 m^2 , weight of up to 20 kg, and thickness varying from 1 mm to 4 mm, depending on the age and place. It is composed of three layers (subcutaneous tissue, dermis and epidermis) and appendages of skin (hair follicles, sweat and sebaceous glands).



Skóra jako miejsce aplikacyjne preparatów kosmetycznych i leczniczych

Skóra, a przede wszystkim zewnętrzna warstwa zrogowaciała (stratum corneum) chroni przed nadmierną utratą wody z organizmu, urazami mechanicznymi, zakażeniem wirusami, bakteriami i grzybami, nadmiernym działaniem UV oraz zapobiega wnikaniu związków chemicznych ze środowiska. Skóra jest największym narządem ludzkiego ciała, którego powierzchnia dochodzi do 2 m², a masa do 20 kg. Grubość, w zależności od wieku i miejsca występowania, wynosi od 1-4 mm. Zbudowana jest z trzech warstw (tkanki podskórnej, skóry właściwej i naskórka) oraz przydatków skórnych (mieszków włosowych, gruczołów potowych i łojowych). Pełni wiele ważnych funkcji, łącząc ciało człowieka ze środowiskiem zewnetrznym, a jednocześnie izolując je od niego. Wnikanie wody, czy niskocząsteczkowych substancji hydrofilowych przez skórę jest powolne i utrudnione lecz możliwe. Wzrost ciężaru cząsteczkowego substancji polarnych uniemożliwia ich przenikanie. Znacznie mniej odporna natomiast jest skóra na działanie związków lipofilnych, które dobrze wnikają i dyfundują do skóry właściwej. W skórze właściwej możemy wyróżnić dwie warstwy brodawkową (stratum papillare) i siateczkową (stratum reticulare). Głównymi elementami wchodzącymi w skład skóry właściwej są fibroblasty (komórki tkanki łącznej, które wytwarzają białka fibrylarne - kolagen i elastynę), makrofagi, komórki tuczne, limfocyty oraz liczne naczynia krwionośne i zakończenia nerwowe. Białka fibrylarne oraz komórki skóry właściwej sa osadzone w bardzo uwodnionej macierzy zewnątrzkomórkowej, w skład której wchodzą glikozaminoglikany (GAG). Glikozaminoglikany, do których zaliczane są między innymi siarczan chondroityny i kwas hialuronowy (HA) należą do polianionów. Makrocząsteczki te posiadają właściwości hydrofilne i mają zdolność tworzenia wiązań wodorowych z hydroksylizyna i hydroksyprolina suprheliksy kolagenu. Głównie HA odgrywa kluczowa rolę w stabilizowaniu kolagenu i jest czynnikiem utrzymującym wodę w skórze właściwej. Na stopień hydratacji wpływa wysoki ładunek ujemny cząsteczki GAG. Kwas hialuronowy ma zdolność wiązania wody w ilości stukrotnie przekraczającej jego ciężar, a uwodniona cząsteczka HA jest około 75 000 razy większa od cząsteczki kolagenu o tej samej masie cząsteczkowej.

Tak wysoka zdolność hydratacji w skórze właściwej jest niezbędna dla transportu substancji czynnych (witaminy C, A, D), składu chemicznego substancji podstawowej i ma odzwierciedlenie w procesach fizjologicznych w otaczających komórkach. Wysoka zdolność wiązania wody utrzymuje prawidłową elastyczność i sprężystość skóry [1-4].

Naskórek jest wielowarstwowym nabłonkiem odnawiającym się w sposób ciągły, a jego wierzchnie warstwy ulegają keratynizacji (RYS. 1). Grubość jego wynosi od 0,3-1,5 mm w zależności od występowania na ciele. Naskórek nie ma naczyń krwionośnych oraz zakończeń nerwowych, ale jego głębsze warstwy są zanurzone w płynie zewnątrzkomórkowym skóry właściwej, skąd dyfundują do niego tlen i składniki odżywcze. Naskórek obejmuje obszar martwy, całkowicie skeratynizowany, do którego należy warstwa rogowa (stratum corneum) oraz żywy gdzie znajduje się warstwa ziarnista (stratum granulosum), warstwa kolczysta (stratum spinosum) oraz warstwa podstawna (stratum basale) [1-6].

Skin performs numerous, important functions, connecting the body with the outer environment and isolating it from the one at the same time. Penetration of water or low-density hydrophilic substances through skin is slow and hindered, but possible. The increase of polar substances' molecular weight makes it impossible for them to penetrate the skin. However, skin is definitely less resistant to lipophilic compounds which penetrate and diffuse dermis well. Dermis is formed by two layers: papillary layer (stratum papillare) and reticular layer (stratum reticulare). The main cells found in dermis are fibroblasts (cells of connective tissue which produce fibrous proteins - collagen and elastin), macrophages, mast cells, lymphocytes; in skin numerous blood vessels and nerve endings are present as well. Fibrous proteins and cells of dermis are fixed in an aqueous gel matrix made of glycosaminoglycans (GAG). The glycosaminoglycans, i.e., hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulphate, are polyanions. These macromolecules have hydrophilic properties and are capable of forming hydrogen bonds with hydroxylysine and hydroxyproline collagen suprhelix. Mainly HA plays a key role in stabilizing the collagen and maintain stable concentration of water in the dermis.

The high negative charge of GAG molecules effects on the degree of skin hydration. Hyaluronic acid has the capacity to bind water in an amount greater than one hundred times its molecular weight. The hydrated HA molecule is about 75 000 times greater than the collagen molecules with the same molecular weight. Such a high hydration capacity in the dermis is essential for the transport of active substances (vitamins C, A, D), the chemical composition of the basic and it reflects in the physiological processes in the surrounding cells. The high water binding capacity maintains proper flexibility and elasticity of the skin [1-4]. The epidermis is a multilayer epithelium regenerating itself in a continuous way, and its outermost layers undergoing a process of keratinisation (FIG. 1). Its thickness is 0.3-1.5 mm, depending on the region of skin being considered. There are no blood vessels or ends nerve fibres in the epidermis, but its deeper layers are bathed in interstitial fluid of the dermis which delivers oxygen and nutrients. The epidermis consists of dead, completely keratinised area (stratum corneum) and living area, where granular layer (stratum granulosum), spinous layer (stratum spinosum) and basal layer (stratum basale) are found [1-6].



RYS. 1. Komórki naskórka człowieka. FIG. 1. Cells in human epidermis.

Warstwa rogowa jako podstawowa bariera

Warstwa rogowa naskórka stanowi podstawowa barierę, która wnosi ograniczenia w sterowaniu wewnatrz i na zewnątrz ruchem substancji chemicznych. Składa się z 15-20 warstw ostro spłaszczonych, metabolicznie nieaktywnych, wielokątnych komórek o grubości około 10 µm oraz zawartości suchej masy o gęstości 1,3-1,4 g/cm³ [5]. Wyróżniamy w jej obrębie obszar warstwy zbitej (stratum compactum) i warstwy złuszczającej (stratum disjunctum). Warstwa rogowa zbudowana jest z korneocytów (posiadających rdzeń i białkowo-lipidową otoczkę zwaną kopertą korneocytu) i lipidowego cementu międzykomórkowego o budowie ciekłokrystalicznej. Cement międzykomórkowy składa się z ułożonych naprzemiennie warstw lipidów (głównie ceramidów, steroli, wolnych kwasów tłuszczowych i węglowodorów) oraz warstewek wody. Lipidy cementu międzykomórkowego powstają w procesach rozwoju i keratynizacji komórek naskórka. W prawidłowo zbudowanej warstwie rogowej występują one w określonych ilościach niezbędnych dla utrzymania ciekłokrystalicznej struktury cementu. Za prawidłową budowę cementu odpowiada ceramid 1 (RYS. 2) zawierający kwas linolowy. Jego obecność warunkuje spoistość całej struktury. Cement międzykomórkowy jest znaczącą barierą dla wody, zmniejsza jej dyfuzję z żywych warstw naskórka do powierzchni skóry, zapobiegając jej wysychaniu [1,2,8-10].

Stratum corneum as a basic barrier

The stratum corneum of the epidermis constitutes a basic barrier which limits the exchange of chemical substances between the cytosol and the external cell environment. Stratum corneum consists of 15 to 20 layers of flattened, polygonal and metabolically inactive cells, about 10 µm thick, with a content of dry matter of density of 1.3 -1.4 g/cm³ [5]. Stratum corneum comprises a compact outer layer (stratum compactum) and an exfoliating layer (stratum disjunctum). The layer is composed of corneocytes (with a core and protein-lipid aureole, called a corneocyte envelope) and a lipid intercellular cement with a liquid crystal structure. The intercellular cement is composed of layers of lipids, organised alternatively (mainly ceramides, sterols, free fatty acids and hydrocarbons) and thin layers of water. Lipids of intercellular cement are created as a result of the epidermis development and keratinisation processes. In a properly structured stratum corneum lipids are present in defined amounts and are indispensable for maintaining liquid crystal structure of the cement. Ceramide 1 (FIG. 2), containing linoleic acid, remains responsible for the adjust structure of the cement. Its presence conditions cohesion of the whole structure. The intercellular cement is a significant barrier for water; it diminishes its diffusion from the living epidermis layers to the surface of the skin, preventing it from drying [1,2,8-10].



RYS. 2. Molekularna struktura ceramidu 1. FIG. 2. Molecular structure of ceramide 1.

Korneocyty w stratum compactum są połączone korneodesmosomami, które po przejściu do stratum disjunctum ulegają degradacji, co daje początek eksfoliacji. Rdzeń korneocytów zbudowany jest z keratyny, filagryny, wody oraz higroskopijnych substancji niskocząsteczkowych wchodzących w skład naturalnego czynnika nawilżającego (Natural Moisturizing Factor, NMF). Korneocyty są utrzymywane razem poprzez wyspecjalizowane struktury zwane korneodesmosomami, które zbudowane są z glikoprotein z rodziny kadheryny głównie z desmoglein i desmokollin [6].

Mechanizm wchłaniania substancji leczniczych przez skórę

Po aplikacji na powierzchnię skóry substancja aktywna zawarta w kosmetykach lub lekach dyfunduje do zrogowaciałego naskórka z rezerwuaru (proces uwalniania). Dalej substancja czynna przenika do głębszych warstw naskórka (proces penetracji) i skóry właściwej, a następnie jest wchłaniana (proces absorpcji) do naczyń krwionośnych, skąd ulega dystrybucji do tkanek. Szybkość, z jaką substancja lecznicza dyfunduje do miejsca przeznaczenia w dużej mierze zależy od warstwy rogowej, która stawia największą barierę podczas wchłaniania przez skórę. Zdolność przenikania substancji aktywnej przez warstwę zrogowaciałą zależy od jej grubości, a ta z kolei od miejsca występowania na ciele. Ogólnie, cieńsza i bardziej przepuszczalna warstwa rogowa występuje od wewnętrznej strony ciała, a grubsza i trudniej przepuszczalna zewnętrznie. Pierwsze preparaty transdermalne były stosowane za uchem.

Corneocytes in *stratum compactum* are connected by corneodesmosomes which after reaching *stratum disjunctum* undergo degradation, which starts exfoliation. The corneocytes' core is made of keratin, filaggrin, water and hygroscopic low density substances, being a part of natural moisturizing factor (NMF). Corneocytes are kept together through highly specialised structures called corneodesmosomes which are made of glycoprotein of the cadherin family, mainly of desmoglein and desmocollin [6].

Mechanism of penetration of medicinal substances through the skin

After skin application, the active substance included in cosmetics and medicines diffuses to the cornified epidermis (release process). Afterwards, it penetrates to deeper layers of epidermis (permeation process) and dermis, and finally it is absorbed by blood vessels. The speed at which the medicinal substance diffuses to the area of destination to a great degree depends on the stratum corneum which offers greatest diffusivity resistance during transdermal permeation. Power of penetration from the cornified epidermis is varied depending on the area of the body. Generally, the inner parts of the body are permeable to a greater extent than the outer ones. The first transdermal preparations were applied in the areas behind the ear.

Wchłanianie zależy również od rodzaju substancji aktywnej/ leczniczej oraz substancji pomocniczych. Substancje aktywne zawarte w kosmetykach i lekach mogą wnikać przez naskórek poprzez przydatki skórne, (gruczoły potowe, łojowe oraz mieszki włosowe) oraz warstwę rogową naskórka, a ich transport do głębszych warstw może odbywać się drogą intercelularną (pomiędzy komórkami naskórka, przez lipidy cementu międzykomórkowego) oraz drogą transcelularną (poprzez komórki naskórka – korneocyty) (RYS. 3).

Najczęściej wchłanianie substancji aktywnej z kosmetyku, czy leku odbywa się na drodze dyfuzji biernej i poprzez transport aktywny. Dyfuzja bierna prowadzi głównie przez cement międzykomórkowy, który składa się w przewadze z obszarów lipofilnych. Proces zachodzi zgodnie z gradientem stężeń i nie wymaga nakładu energii. Przejście cząsteczek zależy jedynie od sił fizycznych (dyfuzji, osmozy i ich energii kinetycznej). W procesie dyfuzji biernej barierę naskórkową mogą pokonywać jedynie substancje o masie cząsteczkowej nie większej niż 3 kDa, apolarne i o charakterze lipofilnym [1]. Transport cząsteczek poprzez dyfuzję czynną (transport aktywny), wymaga dostarczenia energii. W transporcie tvm wykorzystywane sa nośniki, które mają powinowactwo do przenoszonej substancji aktywnej. Energia potrzebna do aktywacji nośnika jest wytwarzana w procesach utleniania lub rozpadu ATP. Substancja aktywna docierając do odpowiedniego miejsca musi przejść kilka etapów po aplikacji preparatu na skórę [11,12]:

 partycja związku pomiędzy podłoże o różnej lipofilności oraz warstwę rogową naskórka,

- dyfuzja związku przez warstwę rogową naskórka,

 partycja związku pomiędzy lipofilną warstwę rogową naskórka, a hydrofilną głębsze warstwy naskórka,

- dyfuzja związku przez kolejne warstwy naskórka oraz skóry właściwej,

 - wchłanianie związku do krwi przez ściany naczyń włosowatych. The penetration is also dependant on the kind of medicinal substance and additives. Active substances included in cosmetics and medicines can penetrate through appendages of skin (hair follicles, sweat and sebaceous glands) and stratum corneum of epidermis. Transport of active substances can occur through an intercellular route (between cells of epidermis, through lipids of intercellular cement) or through transcellular route (through cells of epidermis – corneocytes) (FIG. 3).

Most penetration of an active substance from a cosmetic or medicine takes place by passive diffusion or active transport. Passive diffusion takes place mainly in intercellular cement which to a great extent consists of lipophilic areas. The process does not require delivering energy, it occurs by way of equalising concentration. Particles penetrate according to the concentration gradient, which is dependent exclusively on physical phenomena (diffusion, osmosis and their kinetic energy). In passive diffusion process only substances of molecular weight lower than 3 kDa can overcome the epidermis barrier [1]. Transport of molecules in active diffusion (active transport) requires energy. Carriers which are capable of carrying an active substance are employed here. The energy needed to activate the carrier is created in oxidative phosphorylation in mitochondria or ATP disintegration. After topical administration, on its way to destination, the active substance has to go through a number of stages [11,12]:

- partition of the compound between *vehiculum* of varied lipophilicity and stratum corneum of epidermis,

- diffusion of the compound through stratum corneum of epidermis,

- partition of the compound between lipophilic stratum corneum of epidermis and hydrophilic deeper layers of epidermis,

- diffusion of the compound through subsequent layers of epidermis and dermis,

- penetration of the compound to the bloodstream through walls of capillaries.



Liposomy jako naturalne nośniki substancji kosmetycznych i leczniczych

Duża część fosfolipidów, w środowisku wodnym tworzy spontaniczne, podwójne warstwy fosfolipidowe. Do takich struktur należą liposomy (pęcherzyki fosfolipidowe, pęcherzyki Banghama), będące zamkniętymi kulistymi strukturami błonowymi. Liposomami określa się pęcherzykowate struktury o wielkości od 0,01-1 µm, które otoczone są dwu--warstwa lipidowa. Powstają one samoistnie z fosfolipidów w środowisku wodnym i są wypełnione niewielką ilością roztworu wodnego, z którego powstają. Standardowe liposomy zbudowane są z obojętnych i anionowych lipidów, większość zawiera lecytynę (fosfatydylocholinę), fosfatydyloetanoloaminę (PE), sfingomielinę, fosfatydyloserynę, fosfatydyloglicerol (PG) i fosfatydyloinozytol (PI) [14]. Dzięki takiej budowie pecherzyki mogą zawrzeć leki o różnej lipofilności, działające miejscowo i systemowo. W warunkach in vivo małe liposomy (<100 nm) trudniej opsonizują niż większe. Klinicznie przydatne okazały się liposomy o rozmiarach 50-200 nm. Wykazano, iż tracą one mniej leku i nie ulegają fagocytozie. Duże liposomy mają z kolei tendencję do przedłużonego uwalniania substancji rozpuszczalnych w wodzie [15,16].

Lecytyna

Lecytyna (fosfolipid) to główny surowiec, z którego wytwarzane są liposomy. Należy do ważnych przedstawicieli naturalnych związków powierzchniowo czynnych, zaliczana jest do emulgatorów emulsji typu woda w oleju W/O. Bogatym źródłem lecytyny są żółtka jaj, nasiona soi, rzepak, słonecznik. Otrzymuje się ją przez oczyszczenie "szlamu lecytynowego" w procesie utwardzania olejów. Surowiec ten posiada wiele ważnych właściwości m.in. natłuszcza, uelastycznia skórę, zmiękcza naskórek i ułatwia przenikanie składników aktywnych zawartych w emulsjach kosmetycznych, znany jest z działania antyalergicznego. Lecytyna w organizmie człowieka jest obecna w każdej komórce ciała, przede wszystkim jako składnik błon komórkowych. Fosfolipid ten opóźnia procesy starzenia, wspomaga wykorzystanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, podnosi sprawność krążenia krwi [17,18].

Lecytyna jest brązową substancją o lepkiej konsystencji. Stanowi mieszaninę polarnych i niepolarnych lipidów, przy czym niepolarne stanowią ponad 60% masy mieszaniny. Przed wykorzystaniem lecytyny do celów kosmetycznych poddaje się ją rafinacji. Spośród najbardziej znanych fosfolipidów można wymienić kilka połączeń różniących się ugrupowaniem związanym z resztą kwasu fosforowego (RYS. 4).

Liposomes as natural carriers of cosmetic and medicinal substances

In aqueous environment a large part of phospholipids create spontaneous, double phospholipid layers. Liposomes (phospholipid vesicles, Bangham's vesicles), being spherical membrane structures belong to phospholipids. Vesicle structures of 0.01-1 µm, surrounded by a lipid double-layer are referred to as liposomes. They are created spontaneously from phospholipids in aqueous environment and they are filled with a small amount of aqueous solution that they are formed form. Standard liposomes consist of inert and anion lipids, most of them include lecithin (phosphatidylcholine), phosphatidylethanolamine (PE), sphingomyelin, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylinositol (PI) [14]. Due to such a structure the vesicles can absorb medicines of various lipophilicity, acting locally and systemically. In in vivo conditions small liposomes (<100 nm) do not opsonise as easily as the larger ones do. Liposomes of 50-200 nm turned out to be more clinically useful. It was demonstrated that they lose smaller amounts of medicine and do not undergo phagocytosis. On the other hand, large liposomes tend to release water-soluble substances in an extended period [15,16].

Lecithin

Lecithin (phospholipid) is the main raw material from which liposomes are made. Lecithin belongs to important representatives of natural surfactants and it is classified as water-in-oil (W/O) emulsifiers. Egg yolks, soybeans, rapeseed and sunflower are rich sources of lecithin. It is extracted through "lecithin sludge" purification in the process of oils hardening. The raw material has numerous important properties: it makes the skin more elastic, softens epidermis and facilitates penetration of active components included in cosmetic emulsions. Furthermore, it is known to have anti-allergic properties. Lecithin is present in every cell of human body, mainly as a component of cell membranes. The phospholipid slows down processes of ageing, supports utilisation of vitamins soluble in fats and increases blood circulation efficiency [17,18].

Lecithin is a yellow-brownish substance of sticky consistency. It is a mixture of polar and non-polar lipids, while the non-polar ones constitute over 60% of the mixture weight. Before being used in cosmetic purposes it is refined. Among the best known phospholipids a few combinations can be mentioned, differing in formations bonded with the rest of phosphoric acid (FIG. 4).





BIOMATERING OF

Podział liposomów

Liposomy można podzielić pod względem rozmiaru, ilości warstw otoczki i sposobu wykonania na grupy (RYS. 5):

 Liposomy wielowarstwowe (multilamellar vesicles, MLVs) rozmiar: 0,4-10 µm.

· Liposomy jednowarstwowe (unilamellar vesicles, UVs) - rozmiar: 0.01-1 µm.

- duże liposomy jednowarstwowe (large unilamellar vesicles, LUVs) rozmiar: 0,05-1 µm,

- małe liposomy jednowarstwowe (small unilameller vesicles, SUVs) rozmiar: 0,02-0,03 µm.

 Wielopęcherzykowe liposomy (multivesicular vesicles, MVVs) - rozmiar: > 1 µm.

· Pęcherzyki ogromne (giant unilamellar vesicles. GUV) o wielkości powyżej - rozmiar: > 1 µm.

Metody wytwarzania liposomów

Znanych jest wiele metod wytwarzania liposomów, które wymieniono poniżej, a ważniejsze omówiono.

1. Hydratacja lipidów w obecności rozpuszczalnika

Metoda hydratacji lipidów w obecności rozpuszczalnika jest metodą konwencjonalną. Do tego celu wykorzystuje się kolbę okrągłodenną, w której lipidy rozpuszczane są w rozpuszczalniku organicznym. Następnie suszone są w próżni w celu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika organicznego, w wyniku czego na ściankach kolby osadza się cienki film lipidowy. Wysuszony film jest wówczas hydratowany w fazie wodnej, co powoduje wytworzenie heterogenicznej mieszaniny MLVs, MVVs i kilku LUVs. Ten proces jest przedstawiony schematycznie na RYS. 6. Taka heterogeniczna mieszanina liposomowa zaraz po wytworzeniu może być wyciskana poprzez membrany o znanej wielkości porów w celu wyprodukowania LUVs lub poddana sonikacji do produkcji SUVs [15,16,19].



RYS. 5. Podział liposomów. FIG. 5. Classiffication of liposomes.

Liposome preparation methods

Among the numerous production methods of liposomes only the most important are discussed below.

Liposomes can be di-

1. Hydration of lipids in the presence of solvent

The method of lipids hydration in the presence of solvent is a conventional one. In this method a round-bottom flask is used, where lipids are dissolved in organic solvent. Then they are dried in vacuum in order to remove residues of organic solvent, which results in a thin lipid film being deposited on the flask's walls. The desiccated film is then hydrated in aqueous phase, which causes creation of heterogenic mixture of MLVs, MVVs and a few LUVs. The process is diagrammatically presented in the FIG. 6. Right after preparation such heterogenic liposome mixture can be squeezed out through membranes with known pore diameter in order to produce LUVs or subjected to sonication in order to produce SUVs [15,16,19].



RYS. 6. Hydratacja suchego lipidu. FIG. 6. Hydration of dry lipid.

2. Ultrasonikacja

Metoda wykorzystująca ultradźwieki wykorzystywana jest do wytwarzania jednorodnych rozproszonych małych pęcherzyków SUV-y, które mogą zwiększyć penetrację tkanek. Najpierw poddaje się sonikacji w atmosfera azotu lub argonu przygotowane wcześniej MLVs, wykorzystując dezintegratory zanurzeniowe lub wannowe. W wyniku niszczenia MLVs powstają SUV o średnicy w zakresie od 15-50 nm [20,21]. Wadami tej metody jest m.in. utlenianie wiązań nienasyconych w łańcuchach kwasu tłuszczowego fosfolipidów i hydroliza do lizofosfolipidów i wolnych kwasów. Inną wadą jest, denaturacja lub inaktywacja niektórych termicznie substancji (na przykład, DNA, białka, itp.) w celu ich zamknięcia [16].

3. Prasa Frencha

Prasa Frencha służy do wytwarzania małych liposomów SUVs przez rozbijanie dużych MLV siłami ścinania. W tym celu zawiesina przeciskana jest przez pojedynczy otwór wykorzystując wysokie ciśnienie [21].

4. Metoda wstrzykiwania rozpuszczalników

a) wstrzykiwanie roztworu etanolowego lub roztworu eterowego.

Wstrzykiwanie etanolowego roztworu rozpuszczonych lipidów do szybko mieszanej fazy wodnej zob-

razowano na RYS. 7.

5. Usuniecie detergentu

W metodzie tzw. usuwania detergentów, w których lipid rozpuszcza się w roztworze detergentu o wysokiej wartości krytycznego stężenia miceli. Następnie usuwa się detergent poprzez np. dializę. Ta metoda laboratoryjna nie jest wykorzystywana na skalę przemysłowej produkcji liposomów. Jednak na rynku pojawiły się ekstrudery liposomowe o pojemności ~800 ml.

6. Odparowanie techniką faz odwróconych Metoda ta polega na gwałtownym wstrzyknięciu roztworu wodnego do rozpuszczalnika organicznego, który zawiera rozpuszczone lipidy z równoczesnym działaniem ultradźwięków prowadzącym do formowania się kropel wody w rozpuszczalniku organicznym (emulsja w/o). Otrzymana emulsja jest suszona w rotacyjnej wyparce do wytworzenia się półstałego żelu. Następnie uformowany żel poddawany jest intensywnemu mieszaniu mechanicznemu w celu zainicjowania odwrócenia się faz z w/o

do dyspersji o/w. Podczas mieszania niektóre krople wody zapadają się formując fazę zewnętrzną, podczas gdy pozostała część tworzy uwieziony wodny film. Duże jednorodne pęcherzyki (średnicy 0,1-1 µm) są tworzone podczas tego procesu. Wytwarzanie liposomów za pomocą tej metody wykorzystuje się do zamykania makromolekuł np. jak RNA, enzymy bez straty ich aktywności [16].

7. Przeciskanie przez pory pod wysokim ciśnieniem

Metoda przetłaczania pod wysokim ciśnieniem daje jednorodne SUV. W metodzie tej przygotowaną zawiesinę MLVs wielokrotnie przepuszcza się przez poliwęglanowe membrany o bardzo małych średnicach porów (0,8-1,0 µm) pod wysokim ciśnieniem (najczęściej ciśnienie od 5-10,5 MPa). Wybierając filtry z odpowiednią wielkością porów możemy wytwarzać dowolne średnice pęcherzyków liposomowych. Dzięki tej metodzie otrzymujemy ujednorodnione i małe wielkości liposomów.

8. Metoda zamrażania-rozmrażania

W naczyniach z mieszaniną oziębiającą jak ciekły azot, czy suchy lód umieszcza się zawiesinę liposomów, która zostaje szybko zamrożona. Następnie po całkowitym zamrożeniu umieszcza się ją w łaźni wodnej o temperaturze ~60°C.

2. Ultrasonication

The method, in which ultrasonic waves are used, is applied to prepare homogeneously distributed SUVs vesicles which can increase penetration of tissues. Previously prepared MLVs undergo sonication in nitrogen or argon atmosphere with the application of immersion or tank disintegrators. As a result of MLVs destruction, SUVs of 15-50 nm in diameter are created [20,21]. The disadvantages of this method include oxidation of unsaturated bonds in the fatty acid chains and hydrolysis of phospholipids to lysophospholipids and free acids. Another disadvantage is, denaturation or inactivation of some thermally labile substances (e.g., DNA, proteins, etc.) enclosed in liposomes [16].

3. French press

French press is used to prepare SUV small liposomes through breaking large MLVs with shearing forces. The suspension is pushed through a single opening with the application of high pressure [21].

4. Method of solvents injection

Methods of solvent injection include injection ethanolic solution or injection ether solution.

Injecting ethanol solution of dissolved lipids into guickly stirred aqueous phase has been shown in FIG. 7.



RYS. 7. Wstrzykiwanie etanolowego roztworu rozpuszczonych lipidów. FIG. 7. Injecting ethanolic solution of dissolved lipids.

5. Detergent removal

In this method the detergent, in which lipid is dissolved in detergent solution of high value of critical micelle concentration (CMC), is removed in the process of, e.g. dialysis. The laboratory method is not applied on commercial scale of liposomes production. However, liposome extruders of ~800 ml capacity have been present on the market for some time now.

6. Inverted phases of evaporation

The method consists in intense injection of aqueous solution into organic solvent containing lipids with simultaneous application of ultrasounds leading to formation of water droplets in the organic solvent (w/o emulsion). The obtained emulsion is dried in a rotary evaporator until semisolid gel is created. Then the formed gel undergoes intense mechanical stirring in order to initiate inversion of phases with w/o to o/w dispersion. During mixing some water drops subside forming outer phase, while the remaining part creates bonded aqueous film. Large homogenous vesicles (of 0.1-1 µm in diameter) are created during the process. Preparing liposomes with the application of the described method is used to close macromolecules, as RNA and enzymes, without losing their activity [16].



34

Zamrażanie i rozmrażanie powtarza się kilkakrotnie obserwując zawiesinę liposomów. Metoda ta umożliwia zwiększenie objętości roztworu zamykanego w liposomie, zmniejszenie liczby warstw oraz uzyskanie liposomów LUV [15]. 9. Mikrofluidyzacja

Metoda fluidyzacji to metoda odpowiadająca produkcji na skalę przemysłową. Zaletą mikrofluidyzacji jest wytwarzanie liposomów bez konieczności wprowadzania rozpuszczalników organicznych do rozpuszczenia lipidów. Proces ten jest wykorzystywany w technologii żywości i kosmetyce. Zagęszczona dyspersja lipid/woda jest wprowadzana do mikrofluidyzera, który następnie pompuje pod wysokim ciśnieniem poprzez filtry o wielkości porów od 1-5 µm. Następnie ciecz jest przeciskania przez dwa mikrokanały, a następnie zderza się z dużą prędkością. Ciecz zbierana na końcu jest ponownie zawracana do czasu otrzymania dyspersji wyglądającej na homogeniczną z liposomami o jednakowej wielkości. Technika mikrofluidyzacji wytwarza jednowarstwowe pęcherzyki o średnicach od 50-1000 nm. Wielkość wytwarzanych liposomów podczas procesu jest kontrolowana zmianą ciśnienia np. im mniejsze ciśnienie tym większe pęcherzyki liposomów [16].

Promotory przenikania

Liposomy zbudowane z fosfolipidów są zbyt duże i za mało elastyczne, aby mogły dobrze penetrować i przenikać warstwę rogową. Najczęściej absorbowane są przez stratum corneum, gdzie w górnych jej warstwach następuje fuzja lipidowej otoczki i uwolnienie substancji aktywnej, która następnie swobodnie dyfunduje do głębszych warstw. Problem ze stosowaniem liposomów wiąże się z niestabilnością ze względu na podatność ich na utlenianie i rozpad liposomowej struktury. W tym celu należy optymalizować warunki ich przechowywania i przenikania wprowadzając związki chelatujące oraz przeciwutleniacze jak np.: witaminy A, E, likopen, karotenoidy. Substancja aktywna z liposomu może zostać uwolniona na kilka sposobów np. po przez włączenie do błony komórkowej miejsca docelowego lub na zasadzie fagocytozy - czyli wchłonięcia do wnętrza komórki. Powierzchnię liposomów można modyfikować przez pokrycie jej różnymi polimerami [22,23,24]. Ponadto stosuje się szereg modyfikacji liposomów zwiekszając ich elastyczność i trwałość. Do struktury liposomów wprowadza się prócz fosfolipidów surfaktanty np. polisorbat 80 oraz wiele innych, często syntetycznych cząsteczek. Takimi zmodyfikowanymi układami w celu poprawy przenikania związków aktywnych są: transferosomy, etosomy, polimerosomy, niosomy, katesomy, itp. [25] Lipidowa otoczka liposomów może pełnić także rolę promotora wchłaniania wpływając na właściwości warstwy rogowej zwiększając jej przepuszczalność poprzez zmiany w strukturze cementu międzykomórkowego. Prócz liposomów stosuje się wiele różnych modyfikacji warstwy rogowej stosując promotory przejścia, które mają na celu poprawić jej przepuszczalność dla składników aktywnych. Takie promotory sorpcji powinny być nietoksyczne, szybko przenikać do warstwy rogowej skóry, wywoływać odwracalne zmiany w przepuszczalności stratum corneum, nieaktywne farmakologicznie oraz niedrażniące i nieuczulające. Ważną cechą charakteryzującą bezpieczny promotor sorpcji jest jego odwracalne działanie, tak aby po aplikacji preparatu przywrócona została bariera warstwy rogowej.

Promotorami sorpcji bardzo często są małocząsteczkowe alkohole, glikole, nienasycone kwasy tłuszczowe, terpeny, substancje powierzchniowo czynne itp. Mogą one działać w różny sposób:

- zaburzać uporządkowany układ ciekłokrystaliczny cementu międzykomórkowego,

7. Pushing through pores under high pressure

The method of pushing through under high pressure gives homogenous SUVs. A prepared MLV suspension is repeatedly passed through polycarbonate membranes with very small pores diameters (0.8-1.0 μ m) under high pressure (most often 5-10.5 MPa). Selecting filters with adequate pores size it is possible to produce arbitrary diameters of liposome vesicles. The method allows obtaining homogenous and small sizes of liposomes.

8. Frozen and Thawed - FAT method

Suspension of liposomes is placed in containers with freezing mixture, as liquid nitrogen or dry ice, where it is quickly frozen. Then, after being completely frozen, it is placed in aqueous bath of the temperature of ~60°C. Cycles of freezing and thawing are repeated several times while the liposome suspension is observed. FAT method allows to increase the volume of suspension enclosed in liposome, decrease the number of layers and obtain LUV liposomes [15].

9. Microfluidisation

The method of fluidisation is a method used in production on a commercial scale. One of the advantages of microfluidisation is a possibility of liposomes production without the need of introducing organic solvents to dissolve lipids. The process is used in food technology and cosmetics. Condensed lipid/water dispersion is inserted to micro-diffuser, where it is pumped under high pressure through filters with pores of 1-5 µm in diameter. Then the liquid is pushed through two micro-channels, and collided at high speed. The liquid finally collected is returned again in order to obtain dispersion, looking like homogenous with identical size liposomes. The microfluidisation technology allows to obtain unilamellar vesicles of 50-1,000 nm in diameter. The size of liposomes produced in the process is controlled with changes in pressure, e.g. the lower pressure the larger liposomes vesicles [16].

Penetration activators

Liposomes made of phospholipids are too small and not elastic enough to penetrate the stratum corneum well. Most often, they are absorbed by stratum corneum, where, in its upper layers, fusion of lipid envelope and release of active substance take place. Then the active substance freely diffuses to deeper layers. The problem with applying liposomes is connected with their instability due to their susceptibility to oxidation and disintegration of liposomes structure. In order to avoid that, storing and penetration conditions must be optimised by introducing chelating agents and antioxidants, as vitamins A and E, lycopene or carotenoids. The active substance from liposome can be released in various ways: through inclusion to cell membrane of the target area, or in phagocytosis, that is engulfing into the cell's interior. Liposome surface can be modified by covering it with various polymers [22,23,24]. Moreover, numerous liposomes modifications are used to enhance their elasticity and durability. Apart from phospholipids, surfactants, e.g. polysorbate 80 and many other, often synthetic particles are introduced into liposomes structure. Such modified structures improving active substances penetration include: transferosomes, ethosomes, polymersomes, niosomes, katesomes, etc. [25]. Liposomes lipid envelope can also perform a role of an absorption activator, influencing on the properties of stratum corneum and increasing its permeability through changing the structure of intercellular cement. Apart from liposomes, numerous other modifications of stratum corneum are used by applying transfer activators, which aim is to enhance the layer's permeability for active components.

 zwiększać płynność lub rozpuszczać lipidy cementu międzykomórkowego,

- zmieniać hydratację grup polarnych lipidów [26].

Zastosowanie liposomów

Liposomy znalazły swoje zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i gałęziach przemysłu takich jak biotechnologia, mikrobiologia, przemysł kosmetyczny, farmaceutyczny, spożywczy. Ponadto stosuje się je w wielu dziedzin medycyny, takich jak diagnoza czy terapia. Zastosowanie ich pozwala na ochronę i stabilizację zamykanych w nich składników oraz wprowadzania składników niekompatybilnych. Liposomy jako ważne nośniki lekarstw charakteryzują się niską toksycznością i biokompatybilnością, są szeroko używane w formułach farmaceutycznych [27-29].

Posiadają wiele pozytywnych właściwości na przykład: mogą przenosić zarówno wodę jak i rozpuszczalne w lipidach leki, mogą zawierać micro i makro molekuły, zapewniają długotrwałe uwalnianie i ukierunkowane dostarczanie leku oraz docelowe dostarczenie leku w środowisku nieprzyjaznym, stabilizują biodegradowalne leki i związki aktywne zapewniaiac ochrone przed utlenianiem, poprawiaia stabilizację protein i mogą być aplikowane do organizmu poprzez wiele dróg dostarczania. Liposomy posiadają 3 podstawowe wady: niską stabilność, wolne uwalnianie leku i bardzo dużą akumulacje liposomu w wątrobie i śledzionie [29-31]. Ponadto posiadają także niekorzystne właściwości, takie jak: małą rozpuszczalność, krótki okres półtrwania, problem z docelowym dostarczaniem leku do różnych tkanek ze względu na ich duży rozmiar, fosfolipidy ulegają utlenianiu, szybkie wychwytywanie przez komórki RES, wysokie koszty produkcji i możliwość występowania reakcji alergicznych na składniki liposomalne. Substancja aktywna z liposomu może zostać uwolniona na różne sposoby: poprzez włączenie do błony komórkowej miejsca docelowego lub na zasadzie fagocytozy (wchłoniecia do wnetrza komórki). Powierzchnie liposomów można modyfikować, co może wydłużać okres półtrwania oraz zapobiegać reakcjom z innymi związkami. Do liposomów przyłącza się również ligandy specyficzne dla poszczególnych komórek. Mogą to być białka oddziałujące z odpowiednim receptorem, co powoduje, że lek może wiązać się tylko z określonym miejscem docelowym warunkującym określony efekt biologiczny.

W kosmetologii

Pierwszy produkt kosmetyczny z zastosowaniem liposomów pojawił się na rynku w 1986 roku, był to krem przeciwstarzeniowy opracowany przez firmę Dior [25]. Powodem stosowania liposomów w kosmetyce jest ich łatwość przygotowania i możliwość poprawy absorpcji składników aktywnych przez skórę. Tworzenie liposomów umożliwia wprowadzenie niemal dowolnych substancji czynnych. Do najczęściej transportowanych substancji przez liposomy w preparatach kosmetycznych należą witaminy: A, B, C, E, kolagen, elastyna, pantenol, aminokwasy, kwas hialuronowy, tyrozyna, kofeina, ekstrakty roślinne (miłorząb japoński, aloes, kiełki pszenicy), koenzym Q10, ATP itp. Dzięki tej metodzie możliwe jest kontrolowane, stopniowe uwalnianie, które wykorzystywane jest w preparatach o przedłużonym działaniu. Do produktów kosmetycznych zawierających liposomy możemy zaliczyć kosmetyki pielęgnacyjne, regeneracyjne, przeciwzmarszczkowe, preparaty samoopalające, płyny do twarzy itp. [32]. Najczęściej liposomy stosowane są w układach wodnych, jednak można spotkać struktury polimerowe (mikrosfery) w preparatach bezwodnych takich jak pomadki, czy dezodoranty.

Such sorption activators should be nontoxic, quickly penetrate stratum corneum of the skin, cause reversible changes in stratum corneum's permeability, pharmacologically inactive and inoffensive and should not cause allergies. Very often sorption activators are low-molecular alcohols, glycols, non-saturated fatty acids, terpenes, surface active surfactant, etc. They may act in various ways:

disturb orderly liquid crystal system of intercellular cement,
increase liquidity or dissolve lipids of intercellular cement
change hydration of lipids' polar groups [26].

Application of liposomes

Liposomes are widely used in many fields of science and industry, biotechnology, microbiology, pharmaceutic, food and cosmetic industry, to name a few. In medicine, diagnosis and therapy are also the fields where liposomes have found application. They enable to protect and stabilise components enclosed in them, and introduce incompatible elements. Liposomes, as important carriers of medicines, that are characterised with low toxicity and biocompatibility, are widely used in pharmaceutical formulas [27-29]. Liposomes have many positive advantages for example: they can carry both water and lipid soluble drugs, and can incorporate micro and macro molecules. Furthermore, phospholipids provide stabilization and sustained release and targeted drug delivery or site specific drug delivery in hostile environment, biodegradable drugs can be stabilized from oxidation. They improve protein stabilization and can be administered through various routes. Liposomes have three basic disadvantages: low stability, slow release of medicine and very high accumulation of liposome in liver and spleen [29-31]. Additionally, liposomes have problem with targeting to various tissues due to their large size, phospholipids undergoes oxidation, quick uptake by cells of R.E.S, high production costs. Allergic reactions may occur to liposomal constituents. Active substance from liposome can be released in various ways: through inclusion in cell membrane of the target area, or by way of phagocytosis (vesicular internalization of solids). The surface of liposomes can be modified, which can result in extending the period of half-life and preventing reactions with other compounds. Ligands specific for individual cells can also be bound to liposomes. They may be proteins reacting with a relative receptor, which makes a medicine combine only with a definite target area, giving a desired biological effect.

In cosmetics

The first cosmetic product with liposomes was intrioduced to the market in 1986, and it was an anti-ageing cream developed by Dior company [21]. The main reason why liposomes are used in cosmetics is the ease of their preparation and possibility to increase absorption of active components by the skin. Vitamins A, B, C, E, collagen, elastin, panthenol, amino acids, hyaluronic acid, tyrosine, caffeine, vegetable extracts (ginkgo, aloe, wheat germ), Q10 coenzyme, ATP, and other are substances in cosmetic preparations, most often carried by liposomes. Owing to this method, a controlled, gradual release is possible, which is applied in long-acting preparations. Cosmetic products containing liposomes are functional, regeneration and anti-wrinkle cosmetics, sunless tanning preparations, face lotions, etc. [32]. Liposomes are most frequently used in hydrous arrangements, but polymer structures (micro-spheres) can be encountered in anhydrous preparations such as lipsticks or deodorants. They have been elaborated in order to provide aromatic compounds, herbs and vitamins [23].

Zostały one opracowane w celu dostarczania związków zapachowych, ziół i witamin [23]. Fosfatydylocholina, to jeden z głównych składników liposomów, jest stosowany w produktach do pielęgnacji skóry i szamponach z powodu właściwości zmiękczające i kondycjonujących. W pracy przeprowadzono badania z enzymem YeastCuZnSOD [33] w postaci liposomowej, który otrzymano z drożdży. Drożdże wcześniej zostały poddane fermentacji w pożywce bogatej w cząsteczki miedzi i cynku. Wykazano in vitro, że otrzymany produkt ma doskonałą aktywność przeciwutleniającą, lepszą niż większość popularnych antyoksydantów stosowanych w kosmetyce np.: takich jak tokoferol i polifenole [33]. W pracy [34] omówiono wprowadzenie resweratrolu do liposomów w alginianie. Wzrost stężenia alginianu lub lepkości powoduje wzrost rozmiaru mikrokulek i efektywności enkapsulacji. Badany układ charakteryzował się przedłużonym czasem uwalniania resweratrolu gdzie szybkość dyfuzji zależała od stężenia macierzy alginialu. Mikrokulki liposomu-w--alginianie mogą być wykorzystane do ochrony i przedłużonego w czasie uwalniania naturalnych antyoksydantów [34]. W pracy [35] opisano liposomy bazujące na sfingomielinie, które następnie aplikowano do warstwy podstawnej oraz warstwy rogowej. Zasugerowano, że ten typ liposomów może mieć wpływ na efekt nawilżania oraz funkcje barierowe stratum corneum.

W dermatologii i medycynie

Liposomy stosowane jako czynniki transportujące leki niosą za sobą pewne ograniczenia. Wynikają one przede wszystkim z nietrwałości liposomów, których dystrybucja ograniczana jest przez układ siateczkowo-śródbłonkowy śledziony - RES (Reticulo-Endothelia System), który je rozpoznaje i usuwa z układu krążenia [36,37]. Ich efektywność jest również związana z wyciekaniem, skutkującym uwalnianiem leku do krwiobiegu oraz trudności z pokonywaniem bariery krew-tkanka [38]. Dlatego wprowadzono bardziej trwałe formy liposomów używając np. syntetycznego polimeru - hydrofilowego poliglikolu etylenowego (PEG) [29,31]. Opłaszczając PEG liposomy, uzyskano ciche, niewidoczne liposomy. Liposomy ciche nie są rozpoznawane przez układ RES, co pozwoliło wydłużyć czas ich krążenia i uwalniania substancji aktywnej do krwiobiegu. Ich wadą jednak jest wolne uwalnianie substancji czynnej, prowadzące do niskiej bioaktywności i uodpornienia komórek rakowych na lek. Ułożenie przestrzenne głównych grup PEG stanowi zatem barierę ochronną liposomu, zapobiegając jego interakcjom ze składnikami krwi oraz układem RES [39]. Wykorzystanie tak zmodyfikowanych liposomów zaowocowało wprowadzeniem liposomowej formy doksorubicyny powlekanej poliglikolem etylenowym PEG-DOX (Pegylated Doxorubicin) w zastosowaniach leczenia nowotworów [40].

Wciąż trwają badania nad modyfikacjami pęcherzyków liposomowych w zależności od ich przeznaczenia i sposobu dostarczenia leku. Wielu badaczy [41-43] proponuje w celu poprawy biodostępności leku, zastosowanie liposomów polimerowych o wysokiej czułości pH. Takie nośniki wrażliwe na zmianę pH mogą przenieść lek do cytoplazmy, ponieważ chronią zawartość uwięzioną w cytozolu od środowiska zewnątrzkomórkowego. Liposomy tego typu mogą stać się zatem cennymi, bezpiecznymi i skutecznymi czynnikami w immunoterapii nowotworowej [42]. W pracy [43] dla liposomów pH-wrażliwych wyposażonych w pH czuły aktywator zaproponowano termin fliposomy. Układy dostarczania leków na bazie liposomów posiadają duży potencjał w terapii nowotworowej. Ważna jest kontrolowana i ogólnoustrojowa metoda dostarczania liposomów do komórek nowotworowych. Na przykład sprzężenie liposomów kationowych, zawierających distearylo-glicerylo-difosfoetanoloaminę (DSPE) z polietylenoiminą (PEI) poprawiło dostęp leku do komórek nowotworowych.

Phosphatidylcholine is one of the chief components of liposomes and is used in skin care products and shampoos, owing to its softening and conditioning properties. In the course of the study the analyses were carried out with the Yeast CuZnSOD [33] enzyme in the form of liposomes, which was obtained from yeast. The yeast was earlier subjected to fermentation in the culture medium rich with copper and zinc rich particles. It was demonstrated in vitro that obtained product has excellent antioxidant properties, better than that of most of popular antioxidants used in cosmetic industry, e.g.: tocopherol and polyphenols [33]. The study [34] discusses the introduction of resveratrol into the liposomes in alginate. The increase in alginate concentration or viscosity causes the increase in microspheres sizes and the effectiveness of encapsulation. The arrangement under study was characterized by the prolonged resveratrol release time, where the diffusion rate was dependent on the concentration of alginate matrix. The liposomes microspheres in alginate can be used for the protection and prolonged release of natural antioxidants [34]. The study contains [35] a description based on sphingomyelins which were then applied to the germinative layer and corneous layer. It was suggested that this type of liposomes can influence the moisturizing effect and skin barrier function of the stratum corneum (corneous layer).

In dermatology and medicine

Liposomes applied as carriers of medicines have some limitations. Firstly, they follow from impermanence of liposomes, whose distribution is limited by the reticularendothelial system (RES) which recognises them and eliminates from the blood circulation system [36,37]. Their effectiveness is also connected with discharging drug to blood circulation system and problems with overcoming the blood-tissue barrier [38]. That is why more durable forms of liposomes were introduced, e.g. synthetic polymer - hydrophilic polyethylene glycol (PEG) [29,31]. Through coating liposomes with PEG, quiet and invisible (stealth) liposomes were obtained, invisible for the RES system, which enabled to increase the time of their circulation and release active substances to the blood circulation system. However, their disadvantage is slow release of active substance, which leads to low bioactivity and immunization of cancer cells. Special organisation of main PEG groups constitutes liposome's protective barrier, preventing its interactions with blood components and the RES system [39]. The utilisation of liposomes modified in this way resulted in PEG-DOX (pegylated doxorubicin), liposome form of doxorubicin coated with polyethanol glycol, in treatment of tumour [40].

Research on modifications of liposome vesicles, depending on their purpose and way of medicine delivery, is on its way. Numerous researchers [41-43], in order to improve medicine's bio-accessibility, suggest application of polymer liposomes with high pH sensitivity. Such carriers, sensitive to pH changes, can transport drug to cytoplasm, as they protect the content enclosed in cytosol from the influence of extracellular environment. Thus, liposomes of this kind may become valuable, safe and efficient agents in tumour immunotherapy [42]. In the article [43] a term fliposomes has been suggested for pH-sensitive liposomes equipped with pH-sensitive activator. Systems of drug delivery with the application of liposomes are widely discussed, as they show huge potential in tumour therapy. A controlled and systemic method of liposomes delivery to tumour cells is important. An example can be given that linking cation liposomes, containing distearoyl-sn-glycerodiphosphoethanolamine (DSPE) with polyethylenimine (PEI) improved access of medicine to tumour cells. Intracellular absorption of DSPE-PEI liposomes by tumour cells was higher than the absorption in the case of DSPE liposomes.

Wewnątrzkomórkowa absorpcja liposomów DSPE-PEI przez komórki nowotworu była wyższa niż w przypadku liposomów DSPE. Zatem liposomy DSPE-PEI są interesujące jako nośniki leków skutecznie zwiększających absorpcję i wewnątrzkomórkową lokalizację przeciwnowotworowych leków w tkance nowotworowej przez wstrzyknięcie ich do nowotworu [44].

W dermatologii liposomy stosuje się głównie ze względu na ich właściwości terapeutyczne, gdzie mogą być wykorzystane jako nośniki zarówno hydrofilowych jak i lipofilnych terapeutyków ze względu na ich charakter amfifilowy. Wykorzystywane są jako nośniki leków między innymi w leczeniu atopowego zapalenia skóry, trądziku, łuszczycy, bielactwa, rybiej łuski, przy wypadaniu włosów oraz raka skóry. Liposomy mogą stabilizować niestabilne leki poprzez ich kapsułkowanie, zwiększając możliwości penetracji związków nieprzenikających przez skórę. Pomagają również w zmniejszeniu podrażnień skóry poprzez regulowane uwalnianie leków oraz uwodnienie naskórka. Mogą służyć również do docelowego przenoszenia leków do struktur łojowych, czyli wspomagać leczenie chorób związanych z zaburzeniami mieszków włosowych i gruczołów łojowych [45]. Retinol i hydrochinon są stosowne w leczeniu odbarwień skórnych, jednak wprowadzenie ich razem do preparatu powoduje utlenienie retinolu. Zastosowanie liposomów w takich preparatach umożliwia oddzielenie związków i otrzymanie stabilnego preparatu. Znajdują również zastosowanie w leczeniu atopowego zapalenia skóry AZS. Mutacja genu filagryny wpływa na zaburzenia funkcji i struktury naskórkowej u pacjentów chorych na AZS. Zaburzenia te doprowadzają między innymi do zmniejszenia ilości białka niezbędnego w utrzymaniu prawidłowego kształtu korneocytów i zmiany organizacji blaszek lipidowych. W pracy [45,46] stwierdzono, że po aplikacji liposomów zwiększyło się wydzielanie ciał lamelarnych (lamellar bodies), co prowadziło do poprawy stanu skóry. Ze względu na podobieństwo zachodzące pomiędzy strukturą liposomów i warstwy lipidowej w warstwie rogowej skóry, liposomy wiążą się z keratyną warstwy rogowej naskórka, tworząc cienki film okluzyjny. Prowadzi to do zmniejszenia przeznaskórkowej utraty wody (trans--epidermal water loss) oraz przenikania substancji drażniacych i alergogennych [45-47].

Leki pierwszej i drugiej linii (jak np. nadtlenek benzoilu (BPO), tretynoina, adapalen, klindamycyna) stosowane do leczenia trądziku powodują wiele skutków ubocznych, co prowadzi do niepowodzenia w leczeniu skórnych zmian chorobowych. Zamknięcie leku przeciwtradzikowego w liposomach umożliwia dostarczenie leku w większym stężeniu w miejscu jego aplikacji [45]. W pracy [48] porównano zastosowanie liposomu z 1% roztworem klindamycyny z samym 1% roztworem klindamycyny w leczeniu trądziku. Lek przenoszony przez liposomy wykazał lepsze działanie oraz brak skutków ubocznych. W literaturze [49] opisano porównanie preparatu liposomowego z 0,01% tretynoiną (liposomal tretinoin 0,01%) z ogólnie dostępnymi w handlu żelami zawierającymi tretynoinę. Badania wykazały 1,5 krotne wzmocnienie skuteczności leku z liposomami oraz zmniejszenie efektów ubocznych związanych z terapią tretynoiną.

Analogi witaminy D takie jak kalcypotriol, kalcytriol i takalcytol mają działanie przeciwłuszczycowe ze względu na zwalczanie zapaleń i szybkiego namnażania się komórek naskórka. Autorzy w pracy [50] sugerują, że stosując preparaty liposomowe, stężenie witaminy D₃ może być zmniejszone w porównaniu z obecnie dostępnymi preparatami handlowymi bez pogorszenia efektu terapeutycznego, jednocześnie zmniejszając efekty uboczne (podrażnienie skóry) oraz ogólnoustrojowe. Thus DSPE-PEI liposomes are interesting as carriers of drugs effective for increasing absorption and intracellular localisation of anti-tumour medicines in tumour tissue through injecting into the tumour [44].

In dermatology liposomes are mainly applied due to their therapeutic properties, where they can be used as the carriers of both hydrophilic and lipophilic therapeutics, due to their amphiphilic nature. They are used as the carriers of drugs, among others in the treatment of atopic dermatitis, acne, psoriasis, albinism, ichthyosis, or in hair fall and skin cancer. Liposomes can neutralize unstable medicines through their capsulation, increasing the possibilities of the penetration of the compounds that do not permeate the skin. They also help to reduce skin irritation by the controlled release of medicines and cuticle hydration. They can be used for the target transportation of medicines into the sebaceous structures, that is support the treatment of illnesses related to hair follicles and sebaceous glands disorders. Retinol and hydroquinone are used in treatment of skin discolorations, but if they are introduced to the preparation together, they cause oxidation of retinol. Application of liposomes in such preparations enables to separate the compounds and provides a stable preparation. They are also applied in the treatment of atopic dermatitis. The filaggrin gene mutation influences the disorders of the cuticle functions and structure in patients suffering from atopic dermatitis. Those disorders lead, among others, to the reduction of albumin indispensable in maintaining the correct shape of corneocytes and changes in the organization of lipid laminas. The authors [45,46] find in the study that after applying liposomes the lamellar bodies secretion has increased, which led to the improvement of the skin condition. Due to the similarity between the liposomes structure and the lipid layer in the corneous layer of the skin the liposomes bond with the keratin of the corneous layer of the skin, forming a fine occlusive film. This leads to the reduction of the transepidermal water loss and the permeation of irritating and allergenic substances [45-47].

The medicines of the first and second line (such as, for instance: benzoyl peroxide (BPO), tretinoin, adapalene, clindamycin), used in the treatment of acne, cause numerous side effects, which lead to failure of the treatment of skin lesions. Enclosing the anti-acne medicine in liposomes enables the provision of a drug higher concentration in the place of its application [45]. The study [48] compares the application of liposome with 1%-solution of clindamycin with a single 1%-solution of clindamycin in the treatment of acne. The medicine carried by liposomes demostrated a better result and lack of side effects. The literature [49] also describes a comparison of liposomal tretinoin 0.01% with gels containing tretinoin, generally available on the market. The studies have demonstrated the 1.5-fold improvement of the effectiveness of the medicine with liposomes and the reduction of side effects related to the therapy with tretinoin.

The analogues of vitamin D, such as calcipotriol, calcitriol and tacalcitol, have anti-psoriatic effect due to the fact that they fight inflammations and fast cuticle cell proliferation. The authors of the study [50] suggest that by using liposomal preparations the concentration of vitamin D₃ can be reduced in comparison to the preparations now available on the market without any detriment to their therapeutic effect, at the same time reducing side effects (skin irritation) and systemic effects. Dithranol is a medicine used externally in the treatment of psoriasis. The treatment with Dithranol is highly effective in fighting psoriasis, and at the same time it is troublesome for patients due to its irritating and colouring effects on the skin. Enclosing Dithranol in liposome bubbles enhances its availability in the cuticle, which enables the reduction of the dose and side effects dependent on the dose. Ditranol to lek stosowany zewnętrznie w leczeniu łuszczycy. Terapia ditranolem daje wysoką skuteczność w walce z łuszczycą będąc równocześnie uciążliwą dla chorego ze względu na działanie drażniace i barwiace. Uwięzienie ditranolu w pęcherzykach liposomów wspomaga jego biodostępność w naskórku, co umożliwia zmniejszenie dawki i zależnych od dawki działań niepożądanych. Liposomy znalazły również zastosowanie w leczeniu schorzeń płuc do podawania leków drogą wyziewną w celu uzyskania przedłużonego ich działania [51,52]. Droga oddechowa jest wykorzystywana do dostarczania makromolekuł takich jak proteiny, peptydy, szczepionki, DNA oraz w terapii genowej. Nanonośniki fosfolipidowe są bardzo atrakcyjnymi układami przenoszenia leku w inhalacji aerozolowej. Liposomy ochraniane są przed atakiem systemu immunologicznego płuc poprzez modyfikacje ich powierzchni przy pomocy np. poliglikolu etylenowego PEG zwiększając mukopenetrację poprzez PEGylację i utrzymując uwalnianie leku dla kontrolowanego jego dostarczania. Muralidharan et al. [52] podają zalety stosowania nanoprzenośników fosolipidowych PEG i terapeutyków PEG w aerozolach do podawania donosowo lub drogą wziewną. Liposomy stały się również przedmiotem badań w medycynie diagnostycznej, mogą być stosowane jako środki kontrastujące w obrazowaniu komórkowym i nowotworowym [53]. W tym celu zmodyfikowano paramagnetyczne nanocząsteczki liposomowe w bimodalne neutralne nanocząsteczki obrazujące do zastosowania in vivo. Doniesienia literatury fachowej przedstawiają farmakokinetyczne i farmakodynamiczne modele, które są kluczowe w fizycznym, biochemicznym i fizjologicznym procesie rozprowadzania leków onkologicznych przez preparaty liposomowe. Modele te przetwarzają zaobserwowane dane w współczynniki określające ogólną przeciwnowotworową odpowiedź i w pewnych przypadkach przewidują warunki do optymalizowania kombinacji chemioterapii, które zawierają nanocząsteczkowe nośniki leków [54].

Interesujące wydaje się wykorzystanie preparatów liposomowych bazujących na fullerenach używanych w terapii i obrazowaniu molekularnym [55]. Medycyna fullerenowa jest nową i szybko rozwijającą się dziedziną. Fullereny posiadają wiele właściwości, które można wykorzystać włączając w to właściwości przeciwutleniające, zapobieganie starzeniu, fotodynamiczne terapie przeciwzapalne, rozprowadzanie leku oraz środki kontrastujące w rezonansie magnetycznym.

Podsumowanie

Liposomy jako nośniki związków aktywnych znalazły zastosowanie w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym oraz prężnie bada się je w różnych dziedzinach medycyny. Przede wszystkim badania liposomów skupiają się wokół wprowadzania i ukierunkowanego dostarczania leków przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwzapalnych, dostarczanie leków genowych, środków znieczulających, w leczeniu chorób płuc i chorób skóry.

Liposomy nie są jednak idealnymi układami i posiadają wiele wad między innymi niską stabilność, wolne uwalnianie leku i bardzo dużą akumulację liposomów w wątrobie i śledzionie. W tym celu stosuje się wiele modyfikacji pęcherzyków fosfolipidowych aby poprawić ich stabilność, odporność oraz zapewnić odpowiednie kontrolowane i ukierunkowane uwalnianie leku. Ponadto liposomy znajdują również zastosowanie jako środki kontrastujące w obrazowaniu komórkowym. Liposomy i ich modyfikacje są wciąż obiecującymi układami dla medycyny, przemysłu kosmetycznego. Liposomes are also used in treatment of lung diseases, to be administered by inhalation in order to obtain extended effectiveness of the drug [51,52]. Respiratory tract is used to deliver macromolecules, such as proteins, peptides, vaccines, DNA and in gene therapy. Phospholipid nanocarriers are extremely attractive systems of carrying drug in aerosol inhalation. Liposomes are protected against attacks of the lungs' immune system due to modification of their surface, with the aid of, e.g. PEG polyethylene glycol, increasing mucopenetration through PEGylation and maintaining releasing drug for controlled delivery. Muralidharan P et al. [52] list advantages of application of PEG phospholipid nanocarriers and PEG drugs in intranasal administered aerosols or by inhalation. Liposomes have also become the subject of study in diagnostic medicine, as they can be used as contrast medium in cellular and tumour imaging [53]. In order to achieve this, paramagnetic liposome nanoparticles were modified to bi-modal, neutral imaging nanoparticles to be used in vivo. Literature reports pharmacokinetic and pharmacodynamic models, fundamental in physical, biochemical and physiological process of distribution of oncologic drugs by liposome preparations. Those models process observed data into coefficients determining general anti-tumour response, and in some cases foresee conditions to optimise chemotherapy combinations which contain nanoparticle drug carriers [54].

Utilisation of liposome preparations relying on fullerenes used in therapy and molecular imaging seems interesting [55]. Fullerene medicine is a new and quickly developing domain. Fullerenes have numerous properties to be taken advantage of, including antioxidant and anti-ageing properties, photodynamic anti-inflammatory therapies, distributing drugs and contrast medium in magnetic resonance.

Summary

Liposomes as carriers of active compounds have found application in cosmetics, pharmaceutical and food industry, and undergo large-scale tests in various fields of medicine. First of all, liposomes tests are concentrated on the introduction and directed delivery of anti-tumour drugs, antifungals, anti-inflammatory drugs, delivery of gene medicines, anaesthetics, in lungs and skin diseases treatment.

However, liposomes are not ideal systems and have numerous drawbacks, among other things low stability, slow release of medicine and very high accumulation of liposome in liver and spleen. In order to improve their stability and resistance, and ensure proper release of medicine, various modifications of phospholipid vesicles are used. Moreover, liposomes can also be used as contrast media in cell imaging. Liposomes and their modifications are still promising systems for medicine, cosmetic and food industries.

Piśmiennictwo

References

 Arct J., Pytkowska K.: Budowa i fizjologia skóry. Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów 5 (2002) 3-10.
 Arct J., Pytkowska K.: Nawilżanie i surowce nawilżające. Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów 6 (2002) 2-8.
 Daroszewski J., Rybka J., Gamian A.: Glikozaminoglikany w patogenezie i diagnostyce oftalmopatii Gravesa (Glycosaminoglycans in the pathogenesis and diagnostics of Graves's ophthalmopathy).
 Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej 60 (2006) 370-378.
 Salbach J., Rachner T.D., Rauner M., Hempel U., Anderegg U., Franz S., Simon J-Ch., Hofbauer L.C.: Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. Journal of Molecular Medicine 90 (2012) 625-635.

References

[5] Arda O., Göksügür N., Tüzün Y.: Basic histological structure and functions of facial skin. Clinics in Dermatology 32 (2014) 3-13.
[6] Machado M., Hadgraft J. Lane M.E.: Assessment of the variation of skin barrier function with anatomic site, age, gender and ethnicity. International Journal of Cosmetic Science 32 (2010) 397-409.
[7] Bouwstra J.A., Gooris G.S.: The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems. The Open Dermatology Journal 4 (2010) 10-13.

[8] Rawlings A.V., Scott I.R., Harding C.R., Bowser P.A.: Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level. The Journal of investigative dermatology 103 (5) (1994) 731-740.

[9] Rabionet M., Gorgas L., Sandhoff R.: Ceramide synthesis in the epidermis. Biochimica et Biophysica Acta 1841 (2014) 422-434.

[10] Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S., Ponec M.: Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. Progress in Lipid Research 42 (2003) 1-36.

[11] Starzyk E., Arct J.: Lipofilowość i absorpcja przeznaskórkowa w kosmetyce. Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów 6 (2003) 12-17.

[12] Malinowska M., Sikora S., Ogonowski J.: Transport przeznaskórkowy aktywnych składników kosmetycznych. Wiadomości chemiczne 67 (2013) 321-344.

[13] Shashi P., Anroop N., Vipin S., Neelam S.: Skin kinetics and dermal clearance. International Research Journal of Pharmacy 3(8) (2012) 14-21.

[14] Couto A., Fernandes R., Cordeiro M.N.S., Reis S.S., Ribeiro R.T., Pessoa A.M.: Dermic diffusion and stratum corneum: A state of the art review of mathematical models. Journal of Controlled Release 177 (2014) 74-83.

[15] Kozubek A.: Wstęp do technologii liposomowej. Wrocław 2004 [16] Sivasankar M., Katyayan T.: Liposomes – the future of formulations. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry 1(2) (2011) 259-267.

[17] Kulawik A., Tal-Figiel B., Warżel M.: Lecytyna i jej rola w farmaceutycznych emulsjach suchych. Inżynieria i Aparatura Chemiczna 50 (5) (2011) 62-63.

[18] Raut S., Bhadoriya S.S., Uplanchiwar V., Mishra V., Gahane A., Jain S.K.: Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. Acta Pharmaceutica Sinica B 2(1) (2012) 8-15.

[19] Schlossman M.L.: The Chemistry and Manufacture of Cosmetics (2009).

[20] Huang, C.: Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochemistry 8 (1969) 344-352.

[21] Patil Y.P., Jadhav S.: Novel methods for liposome preparation. Chemistry and Physics of Lipids 177 (2014) 8-18.

[22] Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E.: Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji. LAB 17 (2012) 51-56.

[23] Lasic D.D.: Novel Applications of Liposomes. Trends Biotechnol 16 (1998) 307-321.

[24] Lautenschlager H.: Liposomes, Handbook of Cosmetic Science and Technology, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, (2006). [25] Arora N., Agarwal S., Murthy R.S.R.: Latest Technology Advances in Cosmaceuticals. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 4(3) (2012) 168-182.

[26] Arct J., Chełkowska M.: Czy możliwe jest przewidywanie zdolności wnikania w skórę aktywnych składników produktów kosmetycznych? Wiadomości Polskiego Towarzystwa Kosmetologów 6 (2002) 2-8. 4 (2001) 37.

[27] Torchilin V.P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. Nature Reviews Drug Discovery 4 (2005) 145-160.

[28] Allen T.M., Cullis P.R.: Drug delivery systems: entering the mainstream. Science 303 (2004) 1818-1822.

[29] Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B., Papahadjopoulos D.: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. Pharmacological Reviews 51 (1999) 691-743.
[30] Papahadjopoulos D., Allen T.M., Gabizon A., Mayhew E., Matthay K., Huang S.K., et al.: Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(24) (1991) 11460-11464.

[31] Molineux G.: Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy. Cancer Treatment Reviews 28 (2002) 13-6.

[32] Bartosiewicz D., Kozubek A.: Liposomy w dermatologii i kosmetyce. Lek w Polsce 18(7) (2008) 85-92.

[33] Lods M., Dres C., Johnson C., Scholz D.B., Brooks G.J.: The future of enzymes in cosmetics. International Journal of Cosmetic Science 22 (2000) 85-94.

[34] Isailović B., Djordjević V., Nedović V., Bugarski B.: Liposome--in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. Inside Food Symposium 2013 Leuven, Belgium.

[35] Tokudome Y., Uchida R., Yokote T., Todo H., Hada N., Kon T., Yasuda J., et al.: Effect of topically applied sphingomyelin-based liposomes on the ceramide level in the three dimensional cultured human skin model. Journal of Liposome Research 20 (2010) 49-54.
[36] Park J.W., Benz C.C., Martin F.J.: Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. Semin. Oncol. 31 (2004) 196-205.

[37] Allen T.M., Martin F.J.: Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. Semin. Oncol. 31 (2004) 5-15.

[38] Hwang K.J., Padki M.M., Chow D.D., Essien H.E., L AI J.Y., Beaumier P.L.: Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues. Biochimica et Biophysica Acta 901 (1987) 88-96.

[39] Gabizon A., Martin F.: Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. Drugs 54 (1997) 15-21.

[40] Kik K., Lwow F., Szmigiero L.: Polimerowe i oligomerowe nośniki doksorubicyny. Polimery w Medycynie 37 (2007) 47-55.

[41] Yi-Ting Ch., Chun-Liang L.: PH-Responsive polymer-liposomes for intracellular drug delivery and tumor extracellular matrix switched-on targeted cancer therapy. Biomaterials 35 (2014) 5414-5424.

[42] Yuba E., Tajima N., Yoshizaki Y., Harada A., Hayashi H., Kono K.: Dextran derivative-based pH-sensitive liposomes for cancer immunotherapy. Biomaterials 35 (2014) 3091-3101.

[43] Samoshina N.M., Liu X., Brazdova B., Franz A.H., Samoshin V.V., Guo X.: Fliposomes: pH-Sensitive Liposomes Containing a trans-2-morpholinocyclohexanol-Based Lipid That Performs a Conformational Flip and Triggers an Instant Cargo Release in Acidic Medium. Pharmaceutics 3 (2011) 379-405.

[44] Han H.D., Byeon Y., Jeon H.N., Shin B.Ch.: Enhanced localization of anticancer drug in tumor tissue using polyethylenimine-conjugated cationic liposomes. Nanoscale Research Letters 9 (2014) 209.
[45] Leeuw J., Vijlder H.C., Bjerring P., Neumann Ham.: Liposomes in dermatology today. Jeadv 23 (2009) 505-516.

[46] Fartach M.: Epidermal barrier in disorders of the skin. Microscopy Research and Technique 38 (1997) 361-371.

[47] Fartasch M., Bassukas I.D., Diepgen T.L.: Disturbed extruding mechanism of lamellar bodies in dry non-eczematous skin of atopics. British Journa of Dermatology 127 (1992) 221-227.

[48] Honzak L., Sentjurc M.: Development of liposome encapsulated clindamycin for treatment of acne vulgaris. Eur J Physiol 400 (2000) 44-45.

[49] Patel V.B., Misra A.N., Marfatia Y.S.: Topical liposomal gel of tretinoin for the treatment of acne: research and clinical implications. Pharm Dev Technol 5 (2000) 455-464.

[50] Körbel J.N., Sebök B., Kerényl M., Mahrle G.: Enhancement of the antiparakeratotic potency of calitriol and tacalcitol in liposomal preparations in the mouse tail test. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol 14 (2001) 291-295.

[51] Karolewicz B., Pluta J.: Nowe rozwiązania w technologii leków wziewnych. Farm Pol, 65(11) (2009) 812-820.

[52] Muralidharan P., Mallory E., Malapit M., Hayes Jr. D., Mansour H.M.: Inhalable PEGylated Phospholipid Nanocarriers and PEGylated Therapeutics for Respiratory Delivery as Aerosolized Colloidal Dispersions and Dry Powder Inhalers. Pharmaceutics 6 (2014) 333-353.

[53] Kamaly N., Miller A.D.: Paramagnetic Liposome Nanoparticles for Cellular and Tumour Imaging. International Journal of Molecular Sciences 11 (2010) 1759-1776.

[54] Ait-Oudhia S., Mager D.E., Straubinger R.M.: Application of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis to the Development of Liposomal Formulations for Oncology. Pharmaceutics 6 (2014) 137-174.

[55] Zhou Z.: Liposome Formulation of Fullerene-Based Molecular Diagnostic and Therapeutic Agents. Pharmaceutics 5 (2013) 525-541.



40 SPROSTOWANIE / CORRIGENDUM

1. Dotyczy artykułu / for the paper:

Marcin Sobczak, Ewa Oledzka, Andrzej Plichta, Joanna Kolmas, Urszula Piotrowska: Preliminary study under synthesis and characterization of macromolecular conjugates of camptothecin / Wstępne badania nad syntezą i charakterystyką wielkocząsteczkowych koniugatów kamptotecyny. Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałałów 128-129 (2014) 36-39.

Powinno być / Should read:

Acknowledgments

This work was financially supported by National Science Centre of Poland (OPUS-5 research scheme, grant number DEC-2013/09/B/ST5/03480 entitled: "Elaboration of anti-cancer drug implantational delivery system immobilized on polymer matrix").

Podziękowania

Praca została sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu badawczego (NCN OPUS-5 DEC-2013/09/B/ ST5/03480: "Opracowanie implantacyjnych systemów dozowania leku o działaniu antynowotworowym immobilizowanego na matrycy polimerowej").

2. Dotyczy artykułu / for the paper:

Marcin Sobczak, Joanna Kolmas, Ewa Olędzka, Cezary Dębek: Development of new biodegradable composite delivery systems of bisphosphonates / Badania nad nowymi biodegradowalnymi kompozytowymi systemami dostarczania bisfosfonianów". Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałałów 128-129 (2014) 43-45.

Powinno być / Should read:

Acknowledgments

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

Podziękowania

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



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/biomaterialy-materialy-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 projek- towania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fi- zykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spek- troskopia 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), przyrodni- czych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla me- dycyny. 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 anali- zować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.			
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2015 do 20.10.2015 (liczba miejs Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 47 44, e-mail	c ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) epamula@agh.edu.pl) : 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
---	------------------

• • • • • • • • • • • • • • • •

25th Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

13-16 October 2016 Hotel "Perła Południa" Rytro, Poland www.biomat.agh.edu.pl

