

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

JOURNAL OF POLISH SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS AGH-UST

CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 132

Numer 132

Volume XVIII

Rok XVIII

JULY 2015

LIPIEC 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

Górnictwo-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

Issue: 250 copies

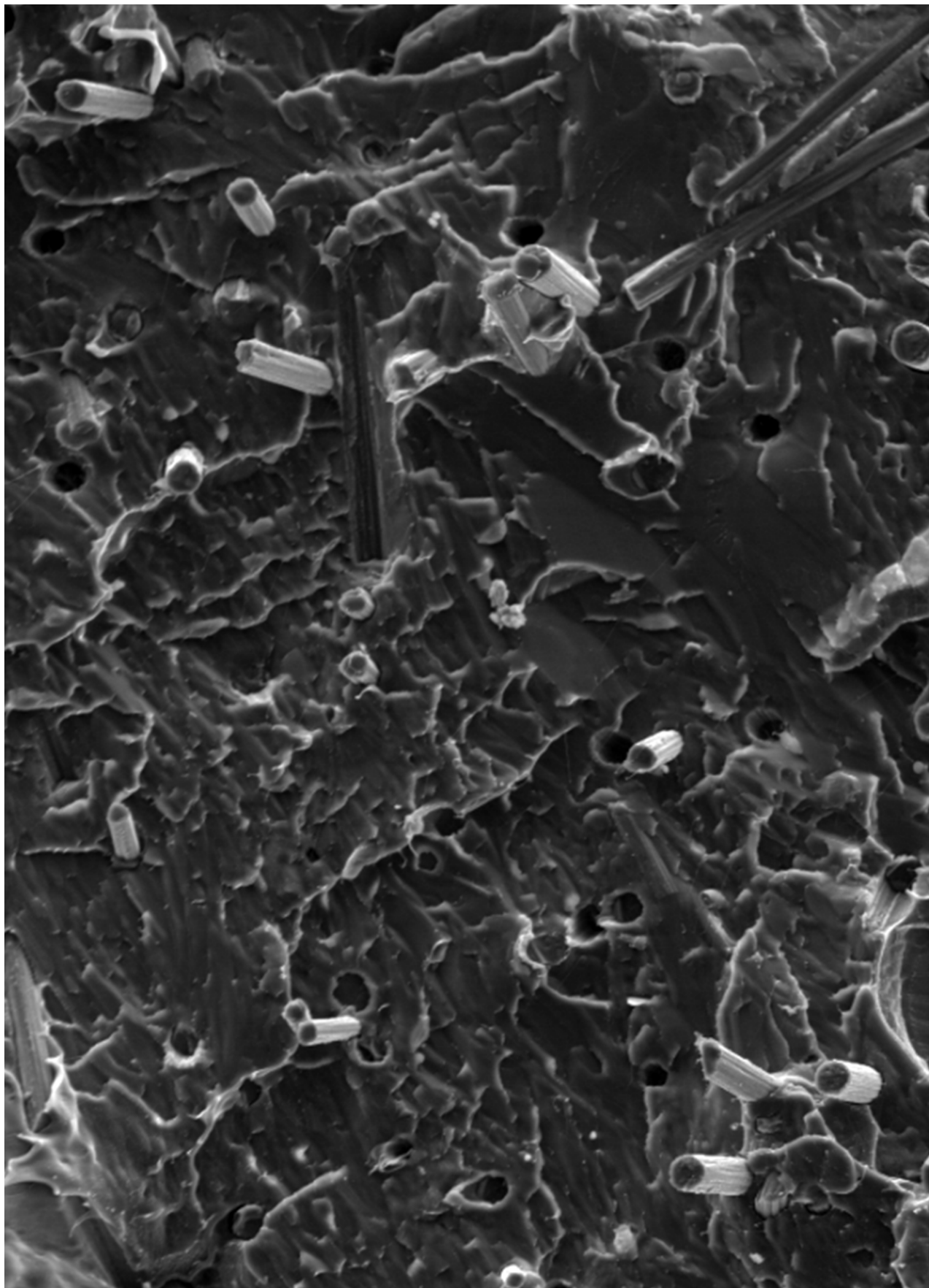
Nakład: 250 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: wn@akapit.krakow.pl



**EDITORIAL BOARD
KOMITET REDAKCYJNY**

EDITOR-IN-CHIEF

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

EDITOR

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

**INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD
MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

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

Romuald Będziński - WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

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

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

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

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

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

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

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

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

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

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

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

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif, .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie.
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:
 - Czasopismo
 - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
 - Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
 - Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
 - al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków
 - tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61
 - tel./fax: (48) 12 617 45 41
 - e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

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

www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

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

Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN

Konto:

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów

30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3

ING Bank Śląski S.A. O/Kraków

nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed.
3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.
4. A manuscript should be organized in the following order:
 - TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words)
 - Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp). High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Address of editorial office:
 - Journal
 - „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”
 - AGH University of Science and Technology
 - Faculty of Materials Science and Ceramics
 - 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland
 - tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61
 - tel./fax: (48) 12 617 45 41
 - e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

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

www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates:

Cost of one number: 20 PLN

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials

30/A3, Mickiewicz Av.

30-059 Krakow, Poland

ING Bank Śląski S.A.

account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

The annual conference of the European Society for Biomaterials

27th European Conference on Biomaterials



www.esb2015.org

ESB 2015

30 August–3 September
Kraków, Poland



SPIS TREŚCI

IN VITRO HEMOCOMPATIBILITY OF THIN FILMS MATERIALS FOR DIRECT BLOOD CONTACT KLAUDIA TREMBECKA-WÓJCIGA, ROMAN MAJOR, JURGEN M. LACKNER, HANNA PLUTECKA	2
BADANIE WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH BEZCEMENTOWYCH PANEWEK STAWU BIODROWEGO WOJCIECH KAJZER, ANITA KAJZER, OLA GRZESZCZUK, JACEK SEMENOWICZ, ADAM MROCZKA	9
HYDROŻELE ALGINIANOWE SIECIOWANE JONOWO I KOWALENCYJNIE JOANNA WALCZAK, JAKUB MARCHEWKA, JADWIGA LASKA	17
BADANIA WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNYCH RESORBOWALNYCH BIOMATERIAŁÓW NA BAZIE POLILAKTYDU WOJCIECH KARALUS, BARBARA SZARANIEC, KAROL GRYŃ, JAN CHŁOPEK, JAN R. DĄBROWSKI, MAREK JAŁBRZYKOWSKI, EWA SZYMANIUK	24

CONTENTS

IN VITRO HEMOCOMPATIBILITY OF THIN FILMS MATERIALS FOR DIRECT BLOOD CONTACT KLAUDIA TREMBECKA-WÓJCIGA, ROMAN MAJOR, JURGEN M. LACKNER, HANNA PLUTECKA	2
ELECTROCHEMICAL STUDY OF UNCEMENTED HIP ENDOPROSTHESIS CUPS WOJCIECH KAJZER, ANITA KAJZER, OLA GRZESZCZUK, JACEK SEMENOWICZ, ADAM MROCZKA	9
HYDROGELS BASED ON IONICALLY AND COVALENTLY CROSSLINKED ALGINATES JOANNA WALCZAK, JAKUB MARCHEWKA, JADWIGA LASKA	17
TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF RESORBABLE POLYLACTIDE-BASED BIOMATERIALS WOJCIECH KARALUS, BARBARA SZARANIEC, KAROL GRYŃ, JAN CHŁOPEK, JAN R. DĄBROWSKI, MAREK JAŁBRZYKOWSKI, EWA SZYMANIUK	24

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

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO

EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE AND HIGHER EDUCATION

IN VITRO HEMOCOMPATIBILITY OF THIN FILMS MATERIALS FOR DIRECT BLOOD CONTACT

KLAUDIA TREMBECKA-WÓJCIGA^{1*}, ROMAN MAJOR¹, JURGEN M. LACKNER², HANNA PLUTECKA³

¹ INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, REYMONTA ST. 25, 30-059 KRAKOW, POLAND

² JOANNEUM RESEARCH FORSCHUNGSGES MBH, INSTITUTE OF SURFACE TECHNOLOGIES AND PHOTONICS, FUNCTIONAL SURFACES, LEOBNER STRASSE 94, A-8712 NIKLASDORF, AUSTRIA

³ DEPARTMENT OF MEDICINE, JAGIELLONIAN UNIVERSITY MEDICAL COLLEGE, ŚW. ANNY ST. 12, 31-008 KRAKOW, POLAND

*E-MAIL: K.TREMBECKA@IMIM.PL

Abstract

When designing new biomaterials for tissue contact devices it is important to consider their architecture as it affects different cell response. Surface modification of tubular structures requires the use of different techniques than in the case of flat samples. Similarly, analytical techniques also need to be adapted to the specific shape of substrate. For blood contacting devices this issue is critical because of shear forces generated by fluid flow and responsible for blood components activation. This necessitates the use of diagnostic techniques dedicated for material analysis in dynamic conditions in order to simulate physiological conditions. In the frame of the work, the flat samples as well as tube like elements were considered. The flat samples were prepared for basic research. Based on the results of the basic research the thin coatings were selected for the internal side of the tube like elements which have been analysed in contact with blood using blood flow simulator. The cross section of the coating-substrate interaction was tested using transmission electron microscopy. The attachment of cells to coatings was determined by radial flow chamber. Hemocompatible analysis was carried out in two ways. The quality of the blood after the dynamic test was analysed using flow cytometry. In this case the aggregates formation, platelet consumption and apoptosis derived microparticles were considered. The amount of cells adhered to the materials surfaces was determined by confocal laser microscopy.

Keywords: hemocompatibility, thin film, protein adsorption, shear stresses

[*Engineering of Biomaterials* 132 (2015) 2-8]

Introduction

The development of regenerative medicine creates new challenges for scientists who search new techniques for the surface modification of biomaterials designed for direct contact with blood [1]. The variety of processes occurring after exposure of material to blood stream including protein adsorption, cell adhesion, and thrombus formation is complex [2-5]. This leads to serious consequences like decrease in peripheral blood pressure, hindered blood flow and can be a reason of implant failure. Because of lack of fully athrombogenic synthetic materials, there is still need to find new methods of materials modification in order to improve their compatibility in contact with blood.

Hemocompatibility is defined as the ability of material to prevent host response after exposure to blood contact [6-8]. International Standard Organisation (ISO) described the methods of the medical devices testing, dedicated for interactions with blood in 10993-4 standard [9]. According to this norm many aspects of blood activation like, protein adhesion, platelet activation, thrombus formation, should be taken into consideration. The tests should simulate clinical conditions as much as possible [10]. However, this standard describe, only list of the proposed diagnostic methods and does not impose the need to use the one specific dedicated for evaluation of biomaterials' hemocompatibility [11]. This is due to the complexity of the issues and the lack of a comprehensive method that would simulate natural conditions. The lack of strict instructions creates a need to develop new techniques that would enable an accurate description of the interactions of blood with artificial surfaces. There are static and dynamic blood-material interactions highlighted in literature [12-14]. Dynamic conditions differ from the static one by the presence of shear forces which are responsible for platelet activation as well as adhered cell detachment or blood components degradation. The forces are generated by the fluid flow and may reach different values depending on different shear conditions. Commercially available tester Impact-R (Diamed, Switzerland) is very popular for describing the influence of shear forces to blood components activation and its adhesion to surfaces [15,16]. Unfortunately, this technique allows to analyse only flat samples [17]. Based on the Impact-R tester main assumptions, for the tubular elements, like artificial cannulas the own blood flow simulator was designed and evaluated.

Interaction of blood with artificial material depends on bio-physical properties of implant. Mechanical and physical properties affect the materials strength and durability. However, the surface of biomaterial has a direct contact with blood and is responsible for its hemocompatibility properties as well. Surface features such as topography or wettability play a key role in blood activation process. Nowadays many works are focused on surface modification by application of ultra-thin coatings deposited by physical (PVD) and chemical (CVD) plasma assisted vapour based method. This technique exhibits high potential due to a wide range of application and wide variety of achieved films. The advantage of this method gives the possibility of metal as well as polymer substrates surface modification. The aim of the research are athrombogenic coatings for the internal side of tubular elements used in heart assist systems. The coatings were deposited firstly on flat substrates in order to determine their biomechanical properties. Based on achieved results the group of coating was selected and deposited on the internal side of poly(vinyl chloride) (PVC) tubes.

Materials and Methods

Flat surfaces preparation

Carbon based coatings were deposited on flat substrates using magnetron sputtering technique in direct current (DC), unbalanced mode. TABLE 1 presents the composition and thickness of the designed films. Coatings were deposited at room temperature in an argon atmosphere. Before deposition, substrates were cleaned ultrasonically with ethanol and dried afterwards in vacuum. After mounting the substrates parallel to the target surface in a ~120 mm distance, the vacuum chamber was pumped down to at least 4×10^{-3} Pa. Substrates were rotated during deposition at a speed of $5.4 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ in order to ensure homogenous film thickness over the entire coated surface. A detailed description of the deposition arrangement is presented elsewhere [18].

TABLE 1. Thin coatings deposited on flat substrates.

Coating	Thickness [nm]
a-C:H	100
Si-DLC	500
Si-DLC	300
Si-DLC	200
Si-DLC	125
Si-DLC	15

Coating deposition for internal side of tubular structures

Thin coatings were deposited on a substrate made of clinically applicable in heart assist system, polyvinyl chloride (PVC). The goal of applying amorphous carbon (a-C:H) and silicon doped amorphous carbon (a-C:H:Si) coatings was to separate the polymer from the tissue environment. The applied coating setup for inner surfaces of tubes based on the gas discharge lamps. The detailed deposition parameters are listed in TABLE 2. The coatings were deposited by a industrially-scaled equipment for plasma polymerization of nanoparticles (Diener Elektronik, Ebhausen, Germany). It consists of a cubic chamber in which the pressure is pumped by a dry vacuum pump. Start pressure was set to 5 Pa for all samples. The PVC substrates were mounted on a vertical rotating cage between square, vertically positioned electrodes.

TABLE 2. The parameters of coatings deposition.

	Starting pressure [mbar]	Gas-flow	Coating pressure [mbar]	Coating time [min]
Pre-treatment (for all Versions)	0.15	6 sccm Ar	0.27	3
Undercoating (for all Versions)	0.15	HMDSO (counter = 340); 3 sccm O ₂	-	0.5
Top coating	Version A	4 sccm C ₂ H ₂	0.60	2
	Version B	10 sccm C ₂ H ₂	1.10	2
	Version C	HMDSO (counter=340); 4 sccm C ₂ H ₂	0.95	2
	Version D	HMDSO (counter=440); 10 sccm C ₂ H ₂	1.20	2
	Version E	HMDSO (counter=440); 16 sccm C ₂ H ₂	1.6	2
	Version F	0.15	HMDSO (counter=340); 4 sccm C ₂ H ₂	0.60

Gases argon (Ar) and acetylene (C₂H₂) and precursor hexamethyldisiloxane (HMDSO) were introduced into the chamber. A pulsed DC discharge (40 kHz frequency) was used. Thin coating depositions occurred in the “volume polymerization mode” at pressures of around 50 Pa in the capacitive pulsed DC discharge, whereby gas mixtures of 20 Pa hexamethyldisiloxane (HMDSO, 99.5%, Sigma Aldrich, Austria) as liquid precursor and 25 Pa argon (99.999%, Linde Gas, Stadl-Paura, Austria) were applied. The whole deposition process was performed at 32°C for controlled precursor vaporization conditions. The constant temperature of the substrate cage was set (<2°C) during nanoparticle deposition. The process of coatings deposition was described in detail elsewhere [19].

Microstructure analysis of coatings

An analysis of the deposited coatings was performed using transmission electron microscopy (TEM). Thin foils for the TEM analysis were prepared on cross-section by means of the focused ion beam method (FIB) on the QUANTA 200 3D device (using a focused gallium ion beam). The device is equipped with a micromanipulator OmniProbe, giving the film exactly the places of interest (defect or phase boundary). The platinum mask was used to distinguish the proper area for examination.

Tribology

Indentation tests were performed at a load of 1 and 2 mN using Berkovich indenter geometry to study microhardness and Young's modulus of the coatings. The rate of loading and unloading was 2 and 4 mN/min respectively. Holding time at maximum load was extended to 5 seconds. The adhesion of the coatings to the substrate was determined by scratch test using 200 μm tip radius Rockwell C indenter. Scratch tests were performed in the range of 0-25 N. The indentation load 25 N due to the cracking of the silicon substrate.

Protein adsorption

Adsorption of protein to flat and tubular materials was analysed using human whole blood. Before experiment, samples were cut into squares of 1 cm² and thoroughly cleaned and sterilized. Surfaces were covered by blood and stored at 37°C with mixing in order to prevent blood sedimentation. After 30 minutes of incubation, materials were washed three times in PBS solution. Adsorbed proteins were removed from the surfaces by sodium dodecyl sulfate solution (SDS, 10%). The protein concentration in received solutions was determined by Qubit Fluorometer 2.0 using Quant-iT Protein Assay Kit (Invitrogen).

Cell-material interaction under hydrodynamic conditions: radial detachment test

Radial flow chamber was used to analyze the strength of cell-material interactions (FIG. 1). This technique allows to determine the influence of shear stresses on cell behavior on the surface [18,21]. It consists of two plates with a space between them (FIG. 1). In the center of the upper plate there is a hole through which fluids (PBS, pH 7.4) is pumped following gravity. Between the plates the analyzed material is inserted. Before the experiment the material surface is covered with red blood cell solution (diluted 400 times) and leaved for 10 minutes in order to lead cell adhesion (FIG. 2). After that time the shear stresses are generated by the fluid flows. At the beginning, in the center of the sample (within the hole) shear forces are applied perpendicular to the material and do not cause cell detachment. Along radius, shear forces act parallel to the surface and can cause cell detachment. The values of applied shear stresses can be calculated using equation $\sigma = 3D\eta / \pi r \cdot e^2$ where, D is the flow rate, which depends on the material, η is the dynamic viscosity of the fluid (10 g/(cm·s)), r is the sample radius, and e is the distance between the disk and the plate set at 150 μm . Under the influence of applied stresses cell detachment can be observed. The condition of the cell detachment from the substrate is the adhesive strength of the cell and the value of the applied stress. Cells remain on the surface not torn off when the value of the adhesive strength to the surface is greater than the applied shear forces. In another case, the 'one by one' or selective detachment is observed. Applied shear forces decrease along radius and near the edges of the disc are equal zero. Here we can observe only spontaneous cell detachment. This phenomenon occurs spontaneously and depends on the affinity of the cell to the substrate. After the experiment the surfaces were analyzed by scanning confocal laser microscopy. The number of adhered cells along radius was calculated by dedicated software (AxioVision, Zeiss).

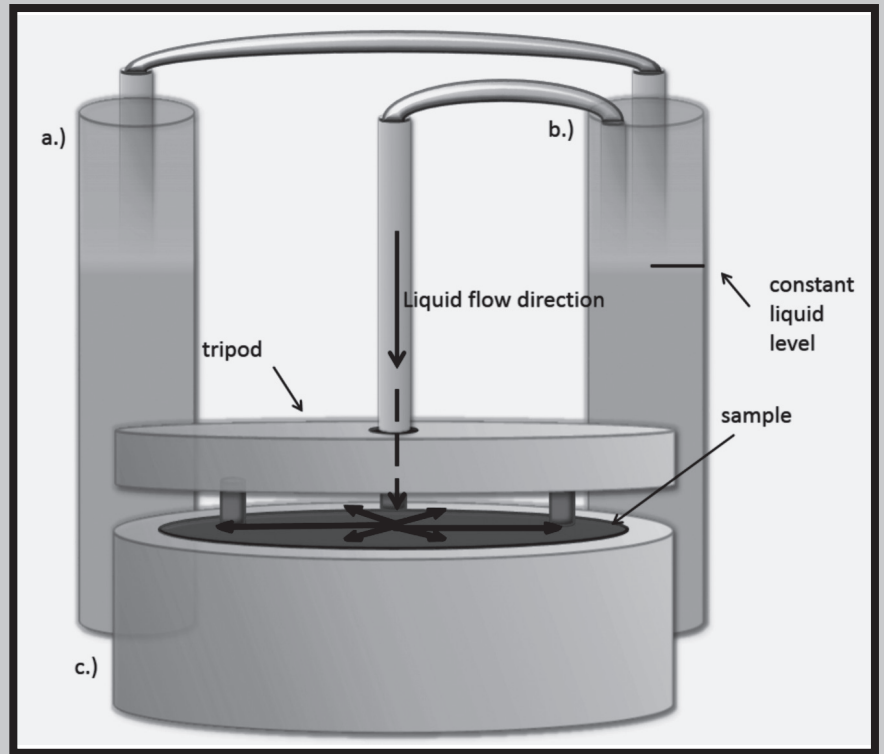


FIG. 1. Schematic illustration of radial flow test; Radial flow chamber assembly (a) working reservoir (b) stress determining reservoir (c) radial flow chamber with sample.

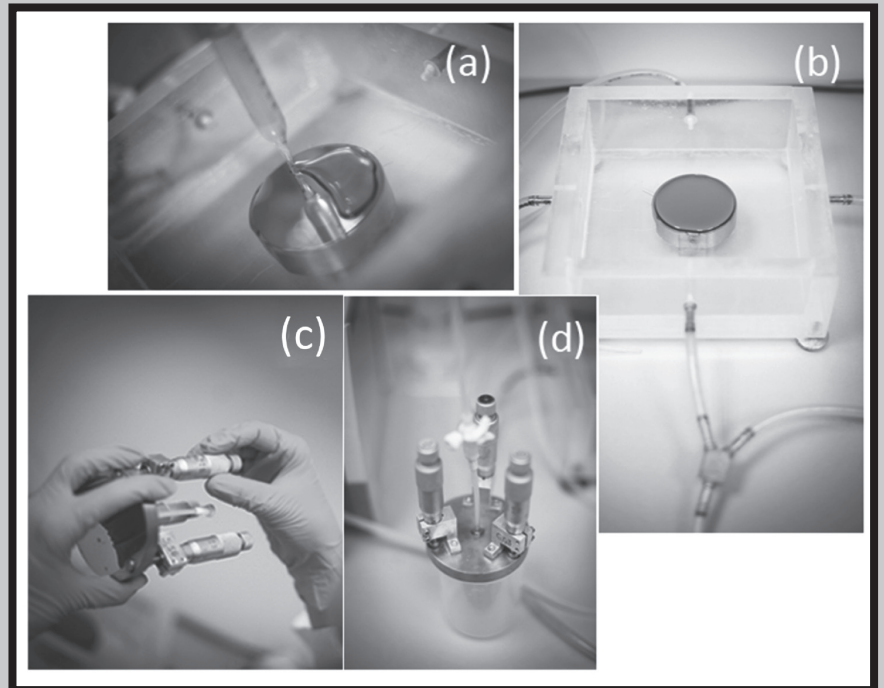


FIG. 2. Stages of the performed analysis using a radial flow chamber (a) cell deposition (b) cell seeding (c) disc adjustment (d) system assembling.

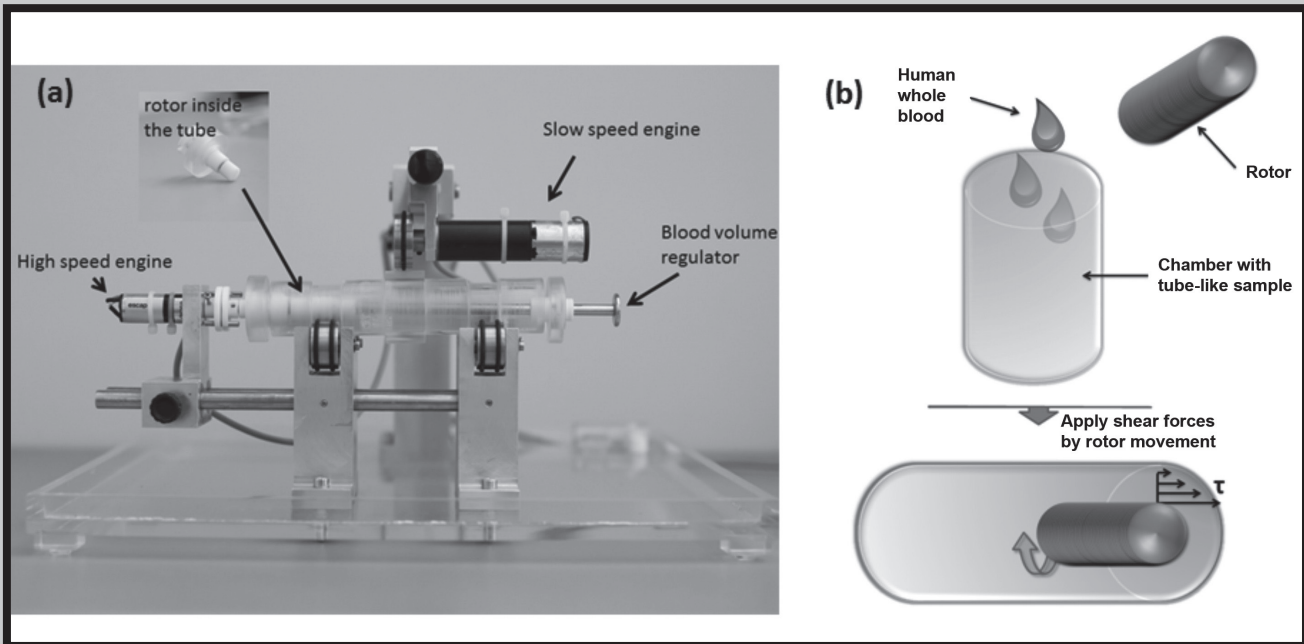


FIG. 3. Blood flow simulator for tubular structure analysis (a) and schematic illustration of experiment (b).

Hemocompatibility of tube-like elements

Hemocompatibility of coatings deposited on the internal side of polyvinyl chloride (PVC) tubes were determined by blood flow simulator (FIG. 3). The detailed description of this method was described elsewhere [20]. For analysis whole human blood collected from healthy volunteer was used. Experiment was performed according to ethic norm and the blood was purchased from the Blood Center in Krakow in accordance to the requirements of health and safety. Cooperation with the Regional Blood Center was specifically stated in the signed agreement. The aliquot of blood (2 mL for sample) was poured into the interior of the tube and the cone shape rotor was placed on the other side of the tube. The whole rotor was immersed in the blood by punch movements. Shear forces were applied by cone rotation for 20 min. After that time blood above sample was collected and analyzed by flow cytometry. Expression of platelet activation markers was measured on CD61 gated objects using PAC-1 antibody for conformational change of glycoprotein IIb/IIIa, and using CD62P for P-selectin. Integrated fluorescence of the activation marker was calculated as a multiplication total of geometric mean fluorescence by percentage of marker-positive objects. Tubes were cut into pieces with dimension 10 mm x 15 mm and analyzed by scanning confocal laser microscopy (CLSM Exciter 5, Carl Zeiss) and dedicated monoclonal antibodies. Cells adhered to material surfaces were fixed and permeabilised for 10 min with 4% paraformaldehyde (PFA). After washing the samples three times for 5 min with PBS, they were incubated with anti-human CD62P P-selectin antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), which is a dye that marks platelets with the P-selectin active receptor. After 30 minutes of incubation, the samples were washed three times with PBS and were covered by the human monoclonal antibody CD45 PE conjugated with Texas Red for 10 minutes. This secondary antibody marks active leukocytes on the material surfaces. Finally, the samples were rinsed three times in PBS and were immediately imaged. The cell densities on the surfaces were measured using the "colocalization" tool of the microscope software (Carl Zeiss Exciter 5 equipped with ZEN 2008). Colocalization analysis was done on the basis considering pixel by pixel analysis.

Results and Discussions

Microstructure

The microstructure (TEM) and distribution of the C, O, Si and Ti elements are shown in FIG. 4. The high-resolution analysis showed the presence of crystalline phases in the amorphous matrix. It is associated with the initial mechanism of the thin film nucleation from the gas phase. Two dimensional thin film nucleation allows achieving mechanical properties, unusual for ceramic coatings. The coating which has reached elastic properties was applied directly on the polymer.

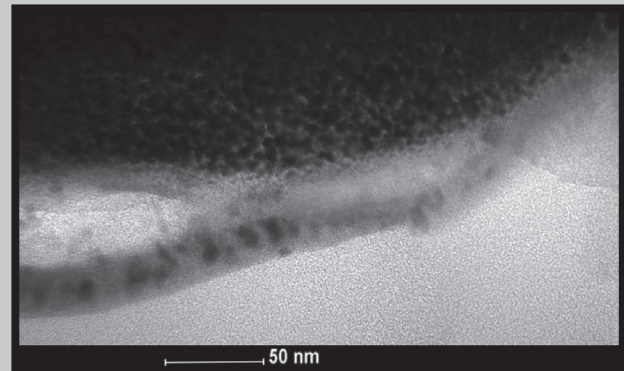


FIG. 4. The microstructure analysis of coating on silicon substrate.

Tribology

The mechanical properties of coatings deposited on flat, silicone substrates are presented in TABLE 3. The coatings have the hardness of 9-15 GPa and Young's Modulus of 129-155 GPa. With decreasing thickness of the coating, the hardness decreases due to the increased impact of the silicon substrate on the measurements. For the control sample (silicone substrate) is about $H = 9$ GPa and $E = 120$ GPa, which practically corresponds to the measurement for the thinnest film thickness 15 nm.

TABLE 3. Microhardness (HiT) and Young's modulus (E) of coatings at a load of 1 and 2 mN. Hmax represents the deepness of material deformation.

Material	Thick-ness [nm]	1 mN			2 mN		
		hmax [nm]	HiT [MPa]	E [GPa]	hmax [nm]	HiT [MPa]	E [GPa]
a-C:H	100	73 ±3	10785 ±1049	129 ±9	100 ±2	10101 ±426	138 ±4
Si-DLC	500	65 ±2	14618 ±1126	155 ±7	93 ±3	13075 ±819	143 ±7
Si-DLC	300	63 ±3	15570 ±1615	148 ±6	93 ±1	13001 ±790	146 ±4
Si-DLC	200	66 ±4	13487 ±1445	145 ±5	95 ±3	11225 ±988	143 ±7
Si-DLC	125	72 ±3	9731 ±1150	140 ±5	99 ±3	9648 ±842	136 ±6
Si-DLC	15	73 ±3	9186 ±614	132 ±7	99 ±3	8373 ±213	135 ±8

Optical micrographs of scratch tracks of films on silicone substrates are presented in FIG. 5. In the case of flat samples, the coatings are characterized by a very good adhesion to substrates. The last film has cracked at load 16 N but has not fall off the substrate despite the small thickness of this coating (15 nm)

Biomechanical properties of cell-material interaction for flat samples

The biomechanical interaction of red blood cells with coatings is presented in FIG. 6. The percentage of attached cells after the radial flow detachment test were calculated and presented as a function of a distance from the center of the sample. Typical washing-out valley can be observed. The narrower and shallower valley represents the stronger interaction of cells with the substrate. In the center of the sample shear forces have the strongest values resulting in significant eluting cells in this area. Due to the design of the tester, the stress is reduced along the radius, the amount of attached cells increases linearly until the plateau is reached. After that, small differences in the number of cells can be observed. These changes may occur due to the local displacement of cells within a sample under the action of static shear stress. The applied stress is too weak to cause cell detachment but strong enough to shift cells along the radius. It also explains the measured value of more than 100% detached cells. For the a-C:H:Si films with thickness of 125 nm and 200 nm almost complete cell detachment ($\geq 99,5\%$) near the center of the sample is observed, which then decreases linearly. The weak cell-material interaction for these cells is confirmed by the small amount of cells at the edges of the disc where shear forces are close to zero. In the case of coatings type a-C:H:Si 500 nm and a-C:H 100 nm at the beginning, cell detachment reaches the value of 90% which shows a stronger interaction of these materials with cells. For a-C:H:Si 300 nm sample a characteristic double plateau shape of function can be observed. The slight (about 3 Pa) decrease in the value of applied shear forces caused a sudden, sharp decline in cells washout. For all samples the threshold stress values were calculated and presented in FIG. 7. These values represent a state where the probability of cell detachment from the surface is 50%. For a-C:H:Si 15 nm the value of threshold stress is the highest.

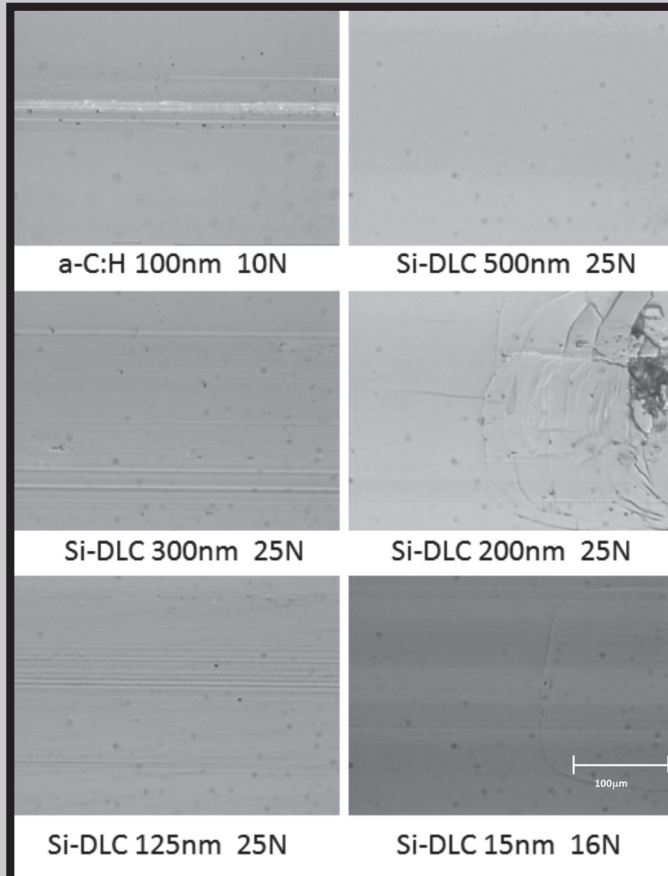


FIG. 5. Optical micrographs of scratch tracks of films on silicone substrates.

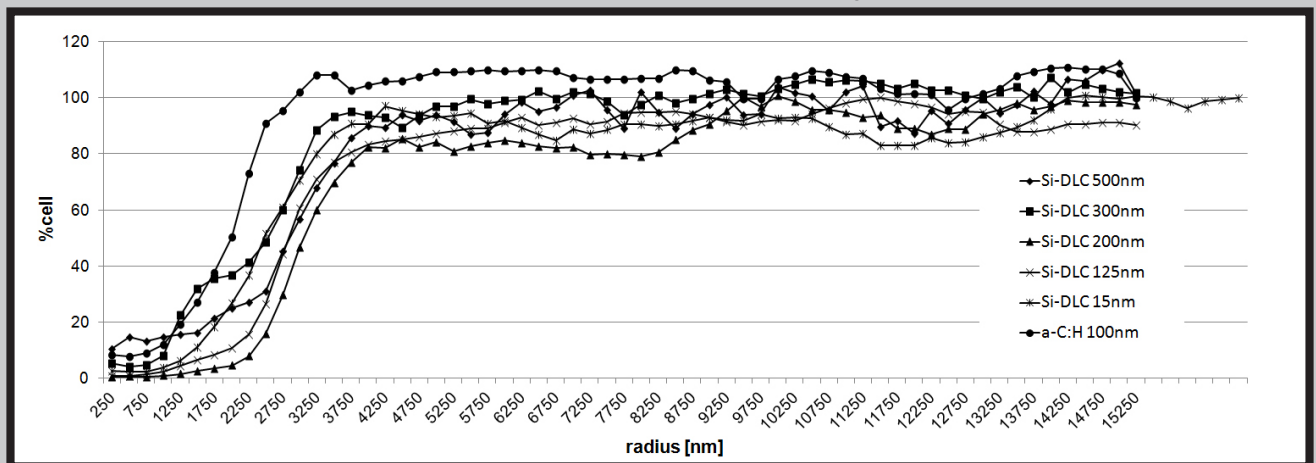


FIG. 6. The percentage of attached cells on a function of distance from the center of the sample after the radial flow detachment test.

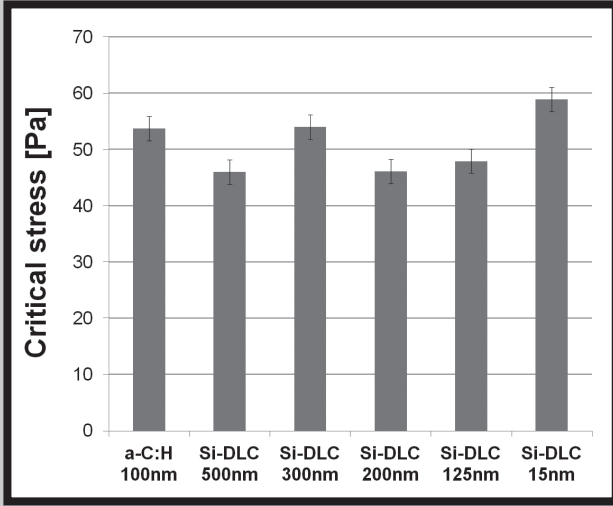


FIG. 7. Threshold stress values.

Protein adsorption

Adsorption of protein to tubular structure is presented in TABLE 4. The results were correlated to the most abundant blood protein – albumin. For two types of coatings (Version B and E) the highest values of protein concentration in comparison to control sample was observed. This indicates an increase in the affinity of these coatings to albumin captured from blood. Albumin is a blood protein which can decrease subsequent thromboembolic events [22-24]. The achieved results may indicate the formation of a densely packed albumin monolayer and may cause the weaker adhesion of platelets and leukocytes to the surfaces of these coatings.

TABLE 4. Protein adsorption from foetal bovine serum (FBS) solution.

Sample	FBS concentration [ug/ml]
control	2.69 ±0.13
Version A	1.96 ±0.04
Version B	3.46 ±1.4
Version C	0.925 ±0.14
Version D	1.99 ±0.014
Version E	3.545 ±0.68
Version F	2.59 ±0.48

Hemocompatibility

Blood-material interaction for tubular structures were analysed by blood flow chamber. The surfaces coverage by platelets and leukocytes were presented in FIG. 8. The relative number of cells was calculated in comparison to control sample and exchange rate per unit area (μm^2). For almost all the samples except sample indicated as Version F improvement in hemocompatibility properties is visible over the control sample. Promising results were obtained for coatings marked as Version B and Version F where a significant decrease in the number of platelets and leukocytes is observed. The surface modification by thin coating deposition has also an impact on cells activation in blood after exposure of materials to blood stream (FIG. 9). Expression of platelet activation markers decreases for all coatings except sample marked as Version D. For this sample the adhesion of platelets to surface is lower than for non-modified surface, but on the other hand, their activation in blood is much stronger. Opposite situation is observed for sample Version F. A small number of active platelets in blood can result from a high affinity of the surface of the film to cells resulting in their strong adhesion. Taking into consideration results obtained for surface and blood analysis, Version B and Version E seem to exhibit the most promising properties of the blood-material interaction.

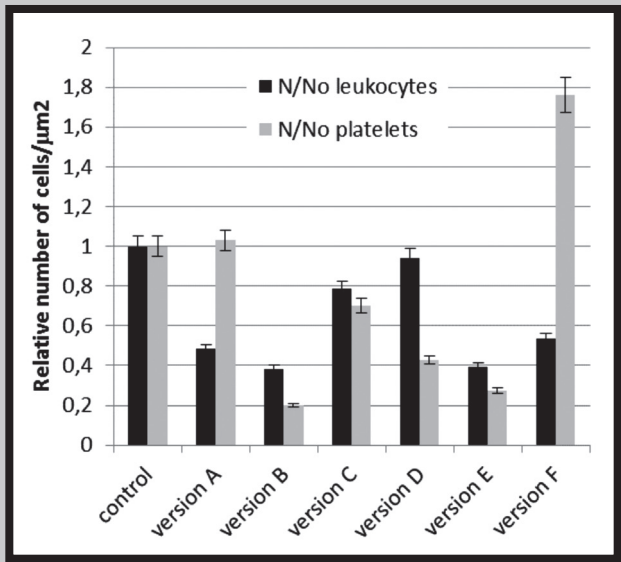


FIG. 8. The relative number of platelets and leukocytes on the surfaces of analyzed materials.

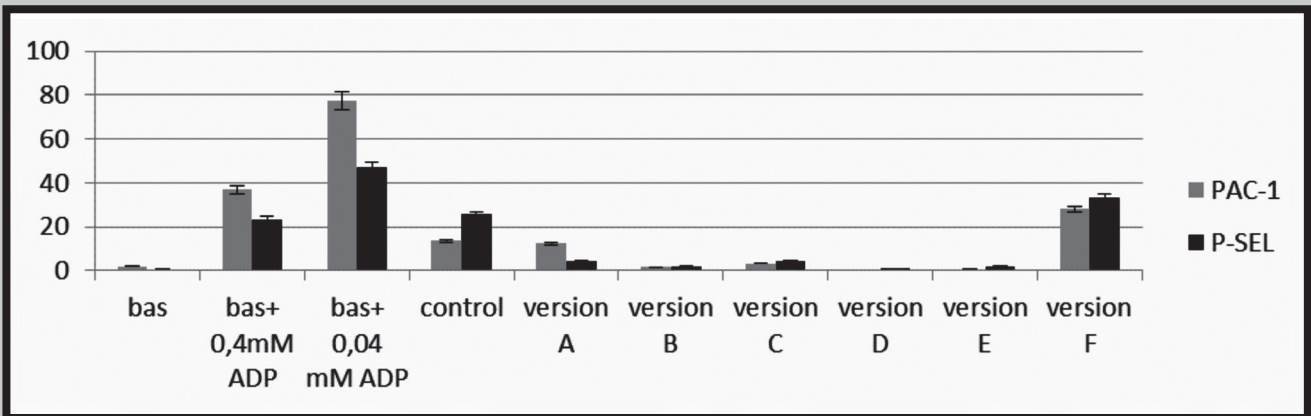


FIG. 9. The PAC-1 and P-SEL expression in leukocytes after dynamic test.

While designing new materials for the direct contact with blood, one should consider their final application. Materials have to be tested in the conditions similar to physiological environment. For biomaterials dedicated for cardiovascular devices many aspects of blood-material interaction should be taken into consideration, like, biomechanical interaction of blood cells with material, protein adsorption, cell adhesion and activation. Untypical architecture of tube-like elements requires the development of novel deposition techniques of the thin coating and the following diagnostic methods. In the frame of the presented work the self-elaborated system dedicated for the analysis of blood-material interactions in dynamic conditions was properly designed and elaborated following 10993-4 rules. Blood flow simulation chamber based on commercially available tester (Impact-R) is dedicated to tubular structures. Using presented method the athrombogenic properties of a-C:H and a-C:H doped with Si coatings were analysed. As part of work the coatings were deposited on flat samples and tested for their biomechanical properties. Microstructure and tribology analyses were used to evaluate the coatings anchoring to the substrates and their hardness and elasticity. Research carried out for the films on flat substrates have enabled the selection of groups of materials, which in a later stage have served to modify the internal side of tubular structures. This has permitted multiscale diagnostics and allowed us to assess the different phenomena occurring on the cell-material interface.

Based on achieved results the following conclusions can be made:

- Ceramic coatings showed elastic properties. This is achieved by the dispersion of crystalline phase uniformly in the amorphous structure. The elastic properties of the ceramic coatings are dependent on the appropriate mechanism of thin nucleation from the gas phase. Such coatings could be applied for the soft polymer substrate modification.
- Materials showing low affinity to platelets attachment can cause their activation in blood.
- The coatings deposited with the high acetylene flow as well as with hexamethyldisilazane (HMDSO) and low acetylene flow in the reactive chamber demonstrated better hemocompatibility. On the basis of the dynamic analysis on blood, the decreased activation of the coagulation system and the immune response compared to the other analyzed coatings was observed. These characteristics prove the selected appropriate parameters.
- The coatings with the highest hemocompatibility properties exhibit high affinity to adsorption of blood protein - albumin. Albumin is known to inhibit clotting process which confirms hemocompatibility properties of these coatings.

Acknowledgments

The research was financially supported by the Project no. 2014/13/B/ST8/04287 "Bio-inspired thin film materials with the controlled contribution of the residual stress in terms of the restoration of stem cells microenvironment" of the Polish National Center of Science.

References

- [1] Lackner J.M., Waldhauser W., Major R., Major L., Hartmann P.: Biomimetics in thin film design - Wrinkling and fracture of pulsed laser deposited films in comparison to human skin. *Surf. Coat. Technol.* 215 (2013) 192-198.
- [2] Gorbet M.B., Sefton M.V.: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 25 (2004) 5681-5703.
- [3] Major R.: Self-assembling surfaces of blood-contacting materials. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 24 (2013) 725-733.
- [4] Xu L.C., Siedlecki C.A.: Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 28 (2007) 3273-3283.
- [5] Chittur K.K.: Surface techniques to examine the biomaterial-host interface: An introduction to the papers. *Biomaterials* 19 (1998) 301-305.
- [6] Kustos R., Gawlikowski M., Gorka K., Jarosz A.: Structure of research stand and evaluation method of blood-biomaterial reaction and mechanical strength of the coating. In: Wilczek P., Major R., editors. *Nanostructural materials for implants and cardiovascular biomedical devices*. Zabrze: M-Studio 2011, 89-97.
- [7] Dadsetan M., Mirzadeh H., Sharifi-Sanjani N., Salehian P.: In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephthalate surface. *J. Biomed. Mater. Res.* 54 (2001) 540-546.
- [8] Huang N., Yang P., Leng Y.X.: Hemocompatibility of titanium oxide films. *Biomaterials* 24 (2003) 2177-2187.
- [9] Seyfert U.T., Biehl V., Schenk J.: In vitro hemocompatibility testing of biomaterials according to the ISO 10993-4. *Biomol. Eng* 19 (2002) 91-96.
- [10] Otto M., Klein C.L., Koehler H., Wagner M., Roehrig O., Kirkpatrick C.J.: Dynamic blood cell contact with biomaterials: validation of a flow chamber system according to international standards. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 8 (1997) 119-129.
- [11] Haefel R.A., *Oberflächen- und Dünnschichttechnologie, Teil 1: Beschichten von Oberflächen*, Springer, Berlin 1987.
- [12] Girdhar G., Bluestein D.: Biological effects of dynamic shear stress in cardiovascular pathologies and devices. *Expert Review of Medical Devices* 5(2) (2008) 167-181.
- [13] Yin W., Shanmugavelayudam S.K., Rubenstein D.A.: The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation. *Thromb. Res.* 127 (2011) 235-241.
- [14] Katritsis D., Kaiktsis L., Chaniotis A., Pantos J., Efstathopoulos E.P., Marmarelis V.: Wall Shear Stress: Theoretical Considerations and Methods of Measurement. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 49 (2007) 307-329.
- [15] Lackner J.M., Major R., Major L., Schoberl T., Waldhauser W.: RF deposition of soft hydrogenated amorphous carbon coatings for adhesive interfaces on highly elastic polymer materials. *Surf. Coat. Technol.* 203(16) (2009) 2243-2248.
- [16] Lackner J.M., Wilczek P., Sanak M., Jakiela B., Stolarzewicz B., Kowalczyk M., Sobota M., Maksymow K., Spisak M., Major B.: Functional cardio-biomaterials. *Advances in Materials Science* 11(2) (2011) 5-25.
- [17] Trembecka-Wójciga K., Major R., Lackner J.M., Major B.: Bio-inspired surface modification. *Inżynieria Materiałowa* 6 (2014) 560-563.
- [18] Trembecka-Wójciga K., Major R., Lackner J.M., Bruckert F., Jasek E., Major B.: Biomechanical properties of the thin PVD coatings defined by red blood cells. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences Technical Sciences* 63 (2015).
- [19] Major R., Lackner J.M., Gorka K., Wilczek P., Major B.: Inner surface modification of the tube-like elements for medical applications. *RSC Advances* 3 (2013) 11283-11291.
- [20] Major R., Trembecka-Wójciga K., Lackner J.M., Major B.: Hemocompatible Thin-Film Materials Recreating the Structure of the Cell Niches with High Potential for Endothelialization. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 9(6) (2015).
- [21] Décavé E., Garrivier D., Bréchet Y., Fourcade B., Bruckert F.: Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys. J.* 82(5) (2002) 2383-2395.
- [22] Goodman S.L., Cooper S.L., Albrecht R.M.: Integrin receptors and platelet adhesion to synthetic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 683-696.
- [23] Brash J.L.: Proteins At Interfaces: Physicochemical And Biochemical Studies. *Macromolecular Chemistry* 9 (1985) 69.
- [24] Lambrecht L.K., Young B.R., Stafford R.E., Park K., Albrecht R.M., Mosher D.F., Cooper S.L.: Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. *Thromb. Res.* 41 (1986) 99.

BADANIE WŁASNOŚCI FIZYKOCHEMICZNYCH BEZCEMENTOWYCH PANEWEK STAWU BIODROWEGO

WOJCIECH KAJZER^{1*}, ANITA KAJZER¹, OLA GRZESZCZUK¹, JACEK SEMENOWICZ², ADAM MROCZKA²

¹ KATEDRA BIOMATERIAŁÓW I INŻYNIERII WYROBÓW MEDYCZNYCH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, UL. ROOSEVELTA 40, 44-800 ZABRZE
² WOJEWÓDZKI SZPITAL CHIRURGII URAZOWEJ IM. JANUSZA DAABA, UL. BYTOMSKA 62, 41-940 PIEKARY ŚLĄSKIE
*E-MAIL: WOJCIECH.KAJZER@POLSL.PL

Streszczenie

Celem prowadzonych badań było porównanie własności panewki nowej oraz po alloplastyce rewizyjnej przebywającej w organizmie człowieka przez 68 miesięcy. W ramach badań przeprowadzono analizę składu chemicznego, własności mechanicznych oraz fizykochemicznych. Własności te analizowano na podstawie badań z wykorzystaniem optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem jarzeniowym, pomiarów twardości oraz badań potencjodynamicznych odporności na korozję wżerową i elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej EIS. Badanie elektrochemiczne przeprowadzono w roztworze Ringera. Dodatkowo przeprowadzono analizę makroskopową powierzchni. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że badane panewki zostały wytworzone ze stali Cr-Ni-Mo spełniającej zalecenia normy ISO 5832-9. Wyniki pomiarów twardości ujawniły obszary o zróżnicowanym umocnieniu biomateriału panewki. Uzyskane parametry odporności korozyjnej dla panewki po implantacji były porównywalne do wartości uzyskanych dla panewki w stanie wyjściowym. Dodatkowo przeprowadzone badania EIS określiły charakter warstwy tlenkowej występującej na powierzchni implantu po usunięciu z organizmu. Wykazały one występowanie warstwy podwójnej stanowiącej dobre zabezpieczenie biomateriału metalowego przed rozwojem niekorzystnych zjawisk korozyjnych. Natomiast przeprowadzone obserwacje makroskopowe ujawniły występowanie warstwy hydroksyapatytu na powierzchni panewki po 68-miesięcznym przebywaniu w organizmie. Podsumowując można stwierdzić, że przyczyną alloplastyki rewizyjnej był brak osteointegracji powierzchni zewnętrznej implantu spowodowany nierównomiernym przyleganiem implantu do powierzchni kości. Nie zaobserwowano jednak zmniejszenia odporności korozyjnej panewki po implantacji, co wskazuje na jej biokompatybilność w środowisku tkankowym.

Słowa kluczowe: stal Cr-Ni-Mo, panewka stawu biodrowego, odporność korozyjna

[Inżynieria Biomateriałów 132 (2015) 9-16]

ELECTROCHEMICAL STUDY OF UNCEMENTED HIP ENDOPROTHESIS CUPS

WOJCIECH KAJZER^{1*}, ANITA KAJZER¹, OLA GRZESZCZUK¹, JACEK SEMENOWICZ², ADAM MROCZKA²

¹ DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES ENGINEERING, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, UL. ROOSEVELTA 40, 44-800 ZABRZE, POLAND
² DR JANUSZ DAAB INDEPENDENT PUBLIC REGIONAL HOSPITAL OF TRAUMA SURGERY IN PIEKARY SLASKIE, UL. BYTOMSKA 62, 41-940 PIEKARY ŚLĄSKIE, POLAND
*E-MAIL: WOJCIECH.KAJZER@POLSL.PL

Abstract

The aim of the research was to compare the properties of the new cup and the cup after alloplastic revision surgery which has been staying in the human body for 68 months. In the studies chemical composition, mechanical and physicochemical properties were analyzed. The properties were analyzed on the basis of studies of glow discharge atomic emission, measurements of hardness and potentiodynamic studies of resistance to pitting corrosion and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The electrochemical research was conducted in Ringer's solution. Additionally, analysis of the macroscopic surface was conducted. The results revealed that the cups were produced from high nitrogen stainless steel which chemical composition and mechanical properties met the requirements of the ISO 5832-9 standards. The results of hardness revealed areas with varied strengthening of the cup's biomaterial. Parameters of the corrosion resistance for the cup after implantation were comparable to the values obtained for the cup in the initial state. Additionally, EIS study determined the nature of the oxide layer on the surface of the implant removed from the body. The results showed the existence of a double layer forming good protection of the metal biomaterial against corrosion. The performed macroscopic observation revealed the presence of hydroxyapatite on the surface of the cup after the 68 months in the body. We conclude that the reason for revision arthroplasty was the lack of osteointegration of the outer surface of the implant caused by non-uniform adhesion of the implant to the bone surface. However, no reduction in corrosion resistance of the cup after implantation was observed which indicates its biocompatibility in the tissue environment.

Keywords: stainless steel, hip endoprosthesis, corrosion resistance

[Engineering of Biomaterials 132 (2015) 9-16]

Materiały stosowane na implanty, np. na endoprotezę stawu biodrowego, powinny charakteryzować się wysoką trwałością w środowisku biologicznym. Obecność płynów ustrojowych oraz działanie naprężeń na endoprotezę może powodować szybszy proces degradacji, a tym samym wpływać na zmianę trwałości i stabilności jej w organizmie człowieka. Każdy biomateriał metalowy reprezentuje określony zespół własności użytkowych zapewniający bezpieczną współpracę implantu ze środowiskiem tkankowym [1]. Jego własności mechaniczne są kształtowane na postawie struktury, a ich prawidłowy dobór zapewnia przenoszenie obciążeń w zakresie sprężystym. Uniemożliwia to uszkodzenie endoprotezy w trakcie użytkowania w organizmie i zapewniła prawidłową stabilizację [2]. Własności mechaniczne tworzyw przeznaczonych na implanty wyznacza się na podstawie statycznej próby rozciągania, ściskania, zginania oraz pomiaru twardości. Dodatkowo przeprowadza się również analizy numeryczne wykorzystujące metodę elementów skończonych, które umożliwiają optymalizację geometrii oraz dobór najkorzystniejszych własności materiałowych [3].

Bardzo ważna jest również biokompatybilność implantu związana bezpośrednio z odpornością korozyjną. Jej obniżenie może prowadzić do komplikacji, wywołanych przedostawaniem się do organizmu produktów korozji [4]. Dobór odpowiedniego zespołu własności fizykochemicznych biomateriału stosowanego na endoprotezę dokonuje się na podstawie badań odporności korozyjnej w warunkach laboratoryjnych, które symulują rzeczywiste środowisko biologiczne organizmu. Dlatego na ich podstawie można określić rodzaj niszczenia korozyjnego endoprotezy [4-7].

Uwzględniając wymienione uwarunkowania związane z biomateriałem metalowym w pracy przedstawiono porównanie składu chemicznego, twardości oraz odporności korozyjnej panewki nowej oraz po 68-miesięcznym przebywaniu w organizmie człowieka. Badania przeprowadzono dla hemisferycznych panewek stawu biodrowego wytworzonych ze stali Cr-Ni-Mo o podwyższonej zawartości azotu spełniającej wg producenta zalecenia normy ISO 5832-9.

Materiał i metody

Do badań wytypowano dwie bezcementowe panewki stawu biodrowego: nową (nr 1) reprezentującą stan wyjściowy oraz panewkę po 68-miesięcznej implantacji (nr 2). Panewki według producenta zostały wytworzone ze stali odpornej na korozję Cr-Ni-Mo, której skład chemiczny i własności mechaniczne powinny być zgodne z zaleceniami normy ISO 5832-9 [8]. Panewka nowa po zewnętrznej stronie całkowicie była pokryta hydroksyapatytem – RYS. 1a, natomiast na powierzchni zewnętrznej panewki nr 2 widoczny był niezresorbowany hydroksyapatyt oraz w górnej jej części wrosnięty fragment tkanki kostnej – RYS. 1b. Przyczyną reimplantacji panewki nr 2 była jej destabilizacja spowodowana zwchnięciem. Zwchnięcie z kolei spowodowane było słabą resorpcją hydroksyapatytu z powierzchni implantu i słabym lub całkowitym brakiem osteointegracji zewnętrznej części panewki z kością.

Do badań przygotowano 18 próbek, na których przeprowadzono badanie składu chemicznego, obserwację makroskopową powierzchni, pomiar twardości oraz badania potencjodynamiczne odporności na korozję wżerową oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej EIS. Badania przeprowadzono na wewnętrznej i zewnętrznej powierzchni panewek.

Introduction

The materials used for implants e.g. hip endoprosthesis, are expected to be characterized by high durability in a biological environment. The presence of body fluids and the effect of stress on the endoprosthesis could cause faster degradation process and modifications in the durability and stability of implants in the human body. Each metal biomaterial represents a particular set of functional properties to ensure a safe cooperation of the implant with tissue environment [1]. The mechanical properties are formed on the basis of the structure and its proper selection ensures the transfer of load in an elastic range. This makes it impossible to damage the hip endoprosthesis in human body and ensure correct stabilization [2]. The mechanical properties of metallic materials intended for implants are determined on the basis of the static tensile testing, compression and bending testing as well as hardness measurements. Furthermore, sometimes finite element analyses focused on geometry optimization and selection of the best material properties are also carried out [3].

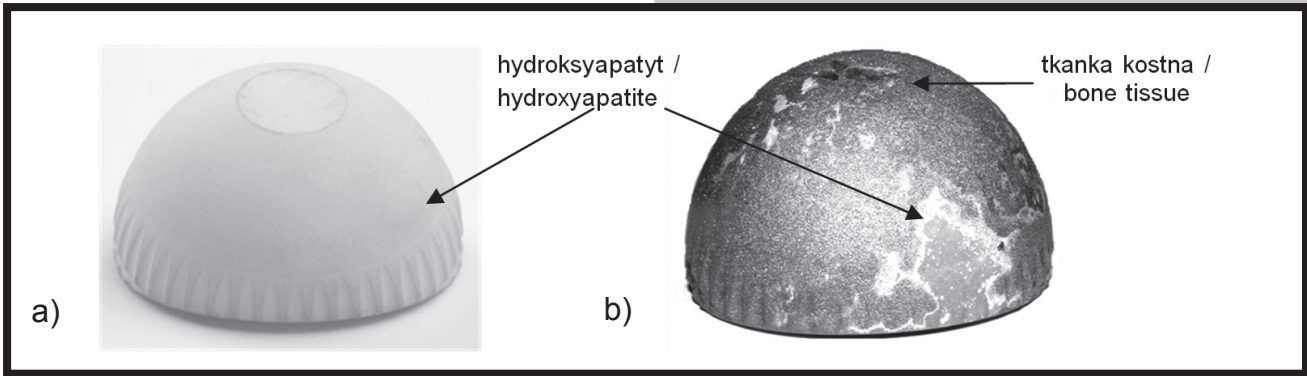
The hip endoprosthesis is a long-term implant; for the reason it is important for it to have an appropriate biocompatibility which is directly connected with corrosion resistance of the implant. It is well known that corrosion products have negative influence on human body [4]. Selection of an appropriate set of physicochemical properties of the biomaterial used for endoprosthesis is made on the basis of corrosion resistance in laboratory conditions simulating the environment of the real organism. Therefore, on this background we can define the type of corrosion damage of the endoprosthesis [4-7].

Taking into account the above mentioned considerations related to the use of metallic biomaterials, the comparison of the results of chemical composition, hardness and corrosion resistance of the new cup and the cup after 68-month of implantation was presented in this paper. The research was conducted for hemispherical hip cups produced from high nitrogen stainless steel which chemical composition and mechanical properties met the requirements of the ISO 5832-9 standard.

Materials and Methods

Two uncemented hip endoprosthesis cups were used in the research: no. 1 - new and no. 2 - cup after 68-month implantation produced from high nitrogen stainless steel which chemical composition and mechanical properties met the requirements of the ISO 5832-9 standard [8]. The cup no. 1 was completely covered with hydroxyapatite on the external surface – FIG. 1a, while the cup no. 2 was covered with not fully resorbed hydroxyapatite on the external surface and in its upper part an ingrown of bone tissue was visible – FIG. 1b. The reason for removal of the cup no. 2 was destabilization caused by dislocation. The dislocation was caused by low resorption of the hydroxyapatite from the surface of the implant or complete lack of osseointegration of the external part of the cup with the bone.

Eighteen samples were selected for the tests. The research consisted of studies of the chemical composition, macroscopic observation of the surface, hardness measurements, corrosion resistance and electrochemical impedance spectroscopy. The research was carried out on internal and external surfaces.



RYS. 1. Badane panewki: a) przed implantacją – panewka nr 1, b) po implantacji – panewka nr 2.
FIG. 1. Tested cups: a) before implantation – cup no. 1, b) after implantation – cup no. 2.

Do badania składu chemicznego wytypowano po jednej próbce z każdej panewki ze stali austenitycznej o podwyższonej zawartości azotu. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem spektrometru LECO GDS500A, służącego do badania składu chemicznego stopów metali. Urządzenie wykorzystuje technikę optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem jarzeniowym.

W celu oceny makroskopowej powierzchni panewek przeprowadzono obserwacje z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego SteREO Discovery.V8 firmy Zeiss przy powiększeniach: 10x i 20x.

W celu określenia własności mechanicznych przeprowadzono pomiar twardości metodą Vickersa zgodnie z zaleceniami normy EN ISO 6507-7:2005 [9]. Pomiaru dokonano na twardościomierzu DuraScan 50 firmy Struers, przy obciążeniu 49 N. Do badania wykorzystano dwie próbki w postaci zglądów poprzecznych ze środkowych części panewek. Zarówno na powierzchni próbki z panewki 1, jak i 2 wykonano po 60 pomiarów. Porównywano wyniki dla dwóch obszarów przedstawionych na RYS. 2.

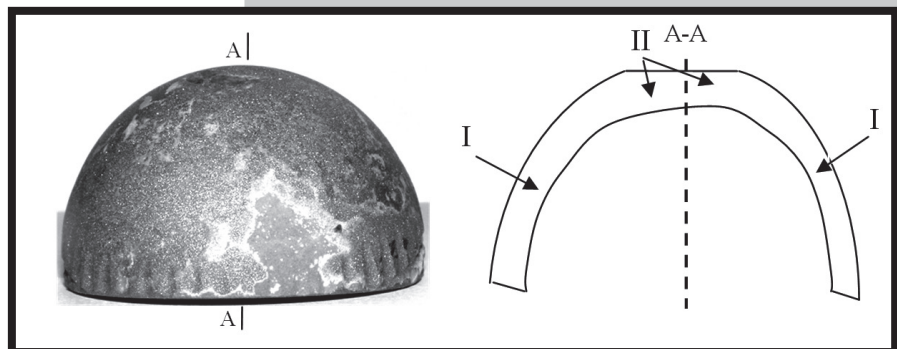
W kolejnym etapie przeprowadzono badanie odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną rejestrując krzywe polaryzacji zgodnie z zaleceniami normy [10]. Układ pomiarowy składał się z celi elektrochemicznej, elektrody pomiarowej w postaci drutu platynowego, nasyconej elektrody kalomelowej (SCE) jako elektrody odniesienia oraz z anody, którą stanowiła badana próbka. W badaniach wykorzystano potencjostat VoltaLab PGP 201 z oprogramowaniem VoltaMaster 4. Badanie rozpoczynano od wyznaczenia potencjału otwarcia E_{OCP} w warunkach bezprądowych w czasie 2 h, a następnie rejestracji krzywych polaryzacji, które rejestrowano od wartości potencjału inicjacji $E_{init} = E_{OCP} - 100$ mV. Zmiana potencjału następowała w kierunku anodowym z szybkością 3 mV/s. Po osiągnięciu gęstości prądu 1 mA/cm² zmieniano kierunek polaryzacji. Na podstawie otrzymanych krzywych polaryzacji wyznaczono: potencjał korozyjny E_{corr} (mV), potencjał przebicia E_b (mV), potencjał repasywacji E_{cp} (mV) oraz z wykorzystaniem metody Sterna opór polaryzacyjny R_p (kΩ·cm²).

One sample of each cup of austenitic stainless steel with increased content of nitrogen was selected for the study of chemical composition. The test was carried out using a spectrometer LECO GDS500A, used to study the chemical composition of the metal alloys. The device uses a technique of glow discharge with atomic emission.

Next stage of the research was macroscopic observations of the surfaces which were conducted with the use of stereomicroscope SteREO Discovery.V8 produced by Zeiss with magnification: 10x and 20x.

Hardness was measured using the Vickers method as recommended by EN ISO 6507-7:2005 standards [9]. The tests were carried out with the use of the machine DuraScan 50 Struers with a load of 49 N. Research was performed on two samples from central parts of the cups. There were 60 measurements carried out on the surfaces of both of the cups' samples. The results for the two areas shown in FIG. 2 were compared.

Next, tests of resistance to pitting corrosion were conducted using the potentiodynamic method consisting of registration of polarization curves in accordance with the standard recommendations [10]. The measurement set up consisted of an electrochemical cell, auxiliary electrode in the form of a platinum wire, reference electrode (SCE) and anode (tested sample). The test was carried out with the use of the VoltaLab PGP 201 system using VoltaMaster 4 software. Corrosion testing was started with the setting of the open circuit potential E_{OCP} . Polarisation curves were registered from the value of initial potential $E_{init} = E_{OCP} - 100$ mV. The polarization rate was equal to 3 mV/s. Once the anodic current density reached the value of 1 mA/cm², the polarization direction was changed. On the basis of the obtained curves, corrosion potential E_{corr} and breakdown potential E_b were determined. Polarization resistance R_p value was determined using Stern's method.



RYS. 2. Przekrój panewki z obszarami pomiarowym I i II.
FIG. 2. Cross section of the cup with the areas of measurement I and II.

Dodatkowo, dla panewki po implantacji w celu uzyskania dodatkowych informacji o własnościach fizykochemicznych powierzchni przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS) [11-13]. Do pomiarów wykorzystano system pomiarowy Auto Lab PGSTAT 302N wyposażony w moduł FRA2 (Frequency Response Analyser) oraz zestaw elektrod taki sam jak w badaniach potencjodynamicznych. Zastosowany układ pomiarowy umożliwił prowadzenie badań w zakresie częstotliwości $10^4 \pm 10^{-3}$ Hz. Amplituda napięcia sinusoidalnego sygnału pobudzającego wynosiła 10 mV. W badaniach wyznaczono impedancyjne widma układu i dopasowano uzyskane dane pomiarowe do układów zastępczych. Na tej podstawie wyznaczono wartości liczbowe oporności R i pojemności C analizowanych układów. Otrzymane widma impedancyjne przedstawiono w postaci diagramów Nyquista dla różnych wartości częstotliwości oraz w postaci diagramów Bode. Otrzymane spektra EIS interpretowano po dopasowaniu metodą najmniejszych kwadratów do zastępczego układu elektrycznego. Wszystkie badania elektrochemiczne zrealizowano w roztworze Ringera o temperaturze $T = 37 \pm 1^\circ\text{C}$ i $\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$.

Wszystkie wartości otrzymanych parametrów z badań podano jako wartości uśrednione z odchyleniem standardowym.

Wyniki i dyskusja

Wyniki analizy składu chemicznego biomateriału panewek przedstawiono w TABELI 1. Przeprowadzona analiza składu chemicznego potwierdziła zgodność składu chemicznego badanych panewek z zaleceniami normy ISO 5832-9. Ponadto stwierdzono, że badane panewki pochodziły z różnych partii materiału ponieważ ilość poszczególnych pierwiastków stopowych nieznacznie się różniła.

W wyniku przeprowadzonych badań makroskopowych obu panewek zaobserwowano zróżnicowaną powierzchnię badanych implantów. Powierzchnia zewnętrzna panewki nowej była równomiernie pokryta hydroksyapatytem na całej powierzchni – RYS. 3a, natomiast na powierzchniach panewek po implantacji można lokalnie zaobserwować pozostałości hydroksyapatytu, który nie został zresorbowany podczas stabilizacji – RYS. 3b. Może wynikać to z lokalnego nieprzylegania panewki do kości, a tym samym nierównomiernego rozpuszczania się hydroksyapatytu. Ponadto zaobserwowano nieznaczne ilości tkanki kostnej przerośniętej do zewnętrznej warstwy powierzchniowej implantu, co potwierdza brak pełnej integracji panewki z kością. Konsekwencją tego była alloplastyka rewizyjna.

In order to obtain additional information on physiochemical properties of the cup after 68 months of implantation EIS study was conducted [11-13]. Measurements were taken using AutoLab's PGSTAT 302N measurement system equipped additionally with the Frequency Response Analyser FRA2 module. The system allowed for tests to be carried out in the frequency range of $10^4 \pm 10^{-3}$ Hz. The amplitude of signal sinusoidal actuating tension amounted to 10 mV. Impedance system spectra were determined and the obtained measurement data were adjusted to the substitute set up. On this basis numerical values of resistance R and capacity C of the analyzed systems were determined. Impedance spectra of the tested system were presented in the form of Nyquist diagrams for different frequency values and in the form of Bode's diagrams. The obtained EIS spectra were interpreted after they had been adjusted according to the method of the smallest squares to the equivalent circuit. All electrochemical tests were carried out in Ringer's solution at $37 \pm 1^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.0 \pm 0.2$.

All of the parameters obtained from the test are given as mean values with standard deviation.

Results and Discussion

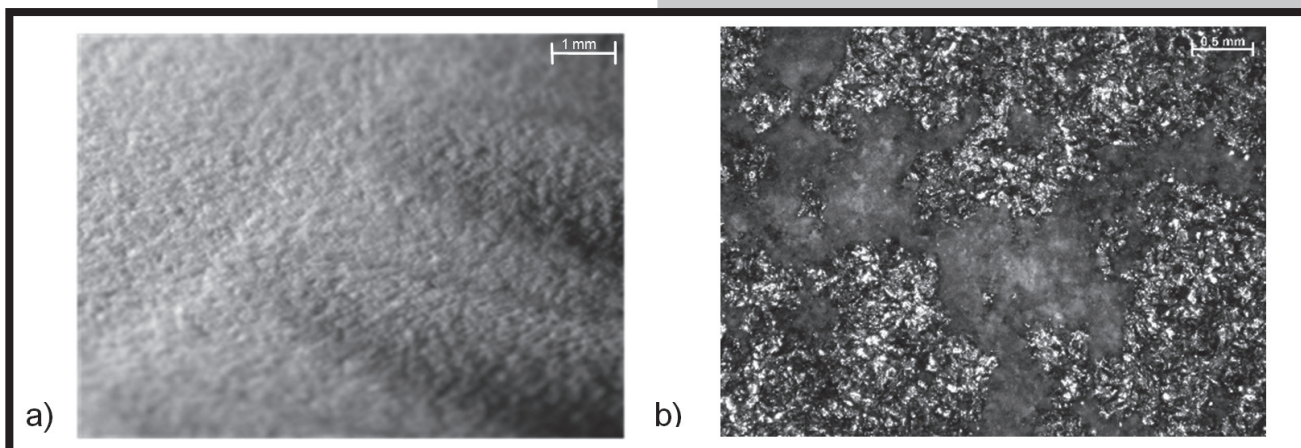
The results of chemical composition analysis are presented in TABLE 1. The analysis of chemical composition confirmed compliance with the recommendations of the ISO 5832-9 standards. Moreover, on the basis of the tests carried out, the differences in the chemical composition of particular groups of samples were observed. The quantity of the alloying elements from cups slightly differs.

On the basis of the tests carried out, the differences in the surfaces of particular implants were observed. The external surface of the new cup was uniformly covered with hydroxyapatite on the whole surface – FIG. 3a, whereas on the surface of the cup after implantation areas of visible unresorbed hydroxyapatite could be locally observed – FIG. 3b. It may result from lack of contact between the cup and the bone and non-uniform dissolution of hydroxyapatite. Moreover, fractional bone tissue grown into the external surface of the implant was observed, which proved loosening of the cup and, as a consequence, led to revision alloplasty.

TABELA 1. Skład chemiczny stali.

TABLE 1. The chemical composition of austenitic steel.

Skład chemiczny / Chemical composition [%]												
Panewka Cup	Cr	Ni	Mo	C	Si	Mn	Nb	S	P	N	Cu	Fe
Wymagania Requirements ISO 5832-9	19.50 – 22.00	9.00 – 11.00	2.00 – 3.00	0.08	0.75	2.00 – 4.25	0.25 – 0.80	0.01	0.02	0.25 – 0.50	0.25	reszta rest
Panewka nr 1 Cup no. 1	20.50	10.50	2.31	0.08	0.72	2.81	0.75	0.01	0.03	-	0.08	reszta rest
Panewka nr 2 Cup no. 2	19.90	10.30	2.52	0.04	0.32	3.20	0.29	0.01	0.02	-	0.04	reszta rest



RYS. 3. Widok powierzchni: a) panewka nr 1, pow. 10x, b) panewka nr 2, pow. 20x - mikroskop stereoskopowy.
FIG. 3. View of the surface: a) cup no. 1, mag. 10x, b) cup no. 2, mag. 20x - stereomicroscope.

Wyniki badań twardości analizowanych panewek przedstawiono w TABELI 2. W oparciu o wyniki pomiaru twardości biomateriału panewki nr 1 stwierdzono, że średnia twardość wynosi 214 HV5, natomiast w próbce z panewki nr 2 - 156 HV5. Wartość twardości panewki po implantacji jest zróżnicowana w zależności od miejsca pomiaru. Ze względu na badane obszary można stwierdzić, że twardość jest największa w obszarze „II” (173 HV5) występującym w jej środkowej części – RYS. 2, natomiast w obszarze „I”, który charakteryzuje boczne, dolne części panewki zaobserwowano jej obniżenie do 141 HV5.

Porównując obydwie panewki stwierdzono, że panewka nowa charakteryzuje się większym umocnieniem materiału w odniesieniu do panewki po implantacji. Może być to spowodowane większą zawartością pierwiastków stopowych w stali.

Wyniki badań odporności na korozję wżerową metodą potencjodynamiczną przedstawiono na RYS. 4 oraz w TABELI 3. Na podstawie krzywych polaryzacji stwierdzono występowanie potencjałów przebicia E_b oraz repasywacji E_{cp} . Odnosząc uzyskane wyniki do wcześniejszych badań autorów [14] panewki w stanie wyjściowym można stwierdzić, że odporność na korozję wżerową obu panewek była porównywalna. Dodatkowo zaobserwowano, że wartości potencjału korozyjnego E_{corr} dla wszystkich badanych próbek mieściły się w przedziale od -139 mV do -24 mV i były większe dla panewki po 68-miesięcznym przebywaniu w organizmie człowieka. Uzyskano również wysokie wartości potencjałów przebicia E_b na wszystkich próbkach w zakresie od +1081 mV dla powierzchni zewnętrznej panewki po 68 miesięcy obecności w organizmie, do +1242 mV dla powierzchni zewnętrznej panewki przed implantacją. Zaobserwowano jednak, że dla panewki nr 2 niezależnie od analizowanej powierzchni (zewnętrzna/wewnętrzna) potencjały przebicia były nieznacznie mniejsze niż w przypadku panewki nowej – TABELA 3. Badania implantów usuniętych z organizmu wytworzonych ze stali Cr-Ni-Mo (AISI 316 LVM), ale o własnościach zgodnych z normą ISO 5832-1 prowadzili autorzy [15]. Otrzymali oni wartości potencjałów przebicia E_b w zakresie od +768 mV do +1130 mV. Uzyskane wyniki wskazują na mniejszą ich odporność korozyjną w porównaniu do analizowanych panewek o składzie chemicznym zgodnym z zaleceniem normy ISO 5832-9.

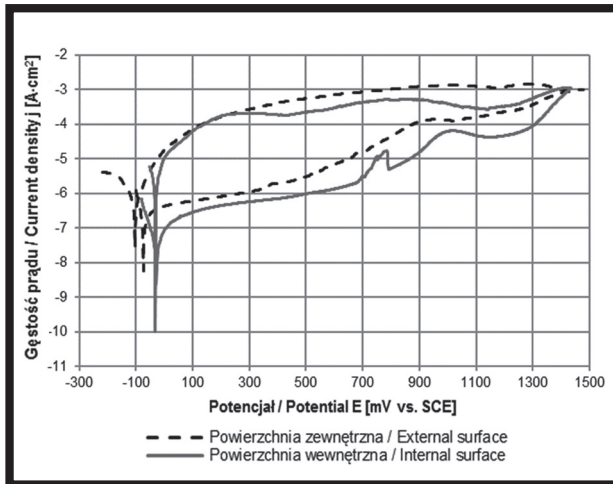
The results of the hardness measurements analysis of cups are presented in TABLE 2. On the basis of the hardness measurements of the biomaterials carried on cup no 1 it was found that the mean value is 214 HV5 and in cup no 2 - 156 HV5. The value of the hardness of the cup after implantation was varied depending on the place of measurement. Due to two test areas it can be concluded that the hardness is the highest in the area “II” (173 HV5) occurring in the central part – FIG. 2, while in the area “I” which marks the side, lower part of the cup the decrease in the hardness (141 HV5) was observed.

Comparing both cups it has been observed that the new cup was characterized by increased degree of hardening of the material with reference to the cup after implantation. It may be caused by the higher content of alloying elements in the steel.

TABELA 2. Wyniki z pomiaru twardości panewek.
TABLE 2. Results of measuring the hardness of the cups.

Panewka Cup	Średnia twardość Mean value, HV5
Panewka nr 1 / Cup no. 1	214 (4)
Panewka nr 2 / Cup no. 2	156 (20)

Results of pitting corrosion test carried out with the use of the potentiodynamic method are presented in FIG. 4 and in TABLE 3. Basing on the obtained polarization curves the existence of breakdown potential E_b and repassivation potential E_{cp} has been stated. Based on the results of the authors' previous research [14] it has been stated that resistance to pitting corrosion of both cups were comparable. Furthermore, it was stated that the values of the corrosion potential E_{corr} for all the tested samples were in the range -139 mV \pm -24 mV, and the highest values were recorded for the cup after the implantation. Moreover, the obtained results revealed the presence of high value of breakdown potential E_b for all the tested samples and ranged from +1081 mV for the external surface of the sample taken from the cup after the implantation up to +1242 mV for the external surface of the cup before implantation. It was observed that for cup no 2, irrespective of the analyzed surface (external/internal) breakdown potentials were slightly smaller than in the case of the new cup. The research on explants made of the AISI 316 LVM stainless steel (ISO 5832-1 standard) was carried out by others [15]. The values of breakdown potential E_b ranging from +768 mV to +1130 mV were obtained. The results showed lower corrosion resistance than in comparison to the analyzed cups made of the stainless steel compatible with the ISO 5832-9 standards.



RYS. 4. Przykładowe krzywe polaryzacji dla panewki nr 2.
FIG. 4. Sample of polarisation curves for cup no. 2.

Ponadto porównując uzyskane wartości oporów polaryzacyjnych R_p – TABELA 3, stwierdzono, że większą aktywnością powierzchni, a tym samym podatnością do rozwoju korozji wykazuje powierzchnia zewnętrzna panewek, co potwierdza topografia tej części implantu charakteryzujący się dużym rozwinięciem.

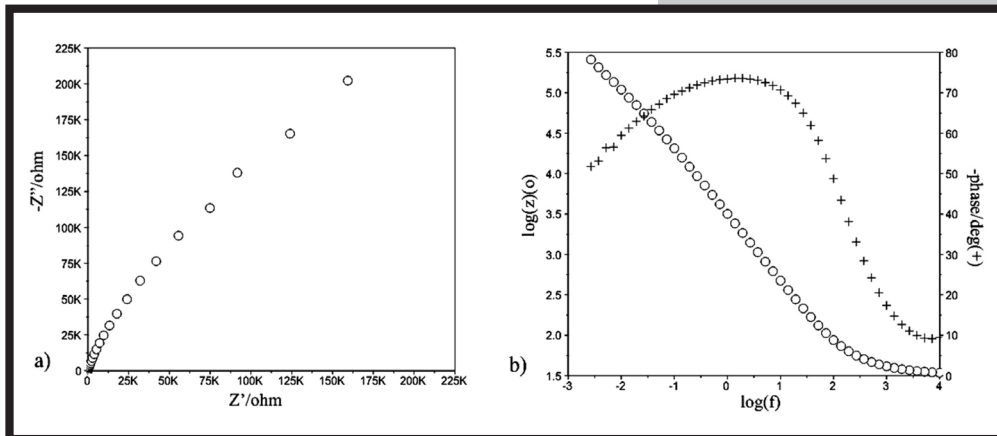
W ostatnim etapie pracy przeprowadzono badania z wykorzystaniem elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej EIS. Wyniki w postaci widm impedancyjnych pozwoliły na zidentyfikowanie charakteru występującej na powierzchni panewek warstwy tlenkowej – RYS. 5 i 6. Wielkości elektryczne wyznaczone na podstawie zarejestrowanych widm zestawiono w TABELI 4.

TABELA 3. Wyniki badań potencjodynamicznych.
TABLE 3. Results of potentiodynamic tests.

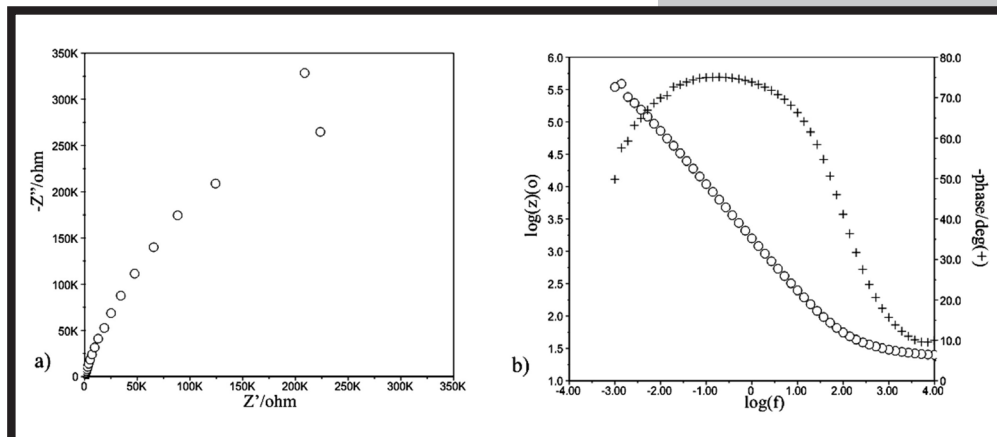
Panewka Cup	Powierzchnia Surface	E_{corr} [mV]	E_b [mV]	E_{cp} [mV]	R_p [$k\Omega \cdot cm^2$]
Nr 1 No. 1 [14]	wewnętrzna internal	-120 (4)	+1230 (12)	-	+61 (10)
	zewnętrzna external	-139 (53)	+1242 (18)	-	+23 (13)
Nr 2 No. 2	wewnętrzna internal	-24 (9)	+1171 (104)	-32 (10)	+179 (20)
	zewnętrzna external	-47 (19)	+1081 (108)	-53 (16)	+75 (18)

Moreover, comparing the results of polarization resistance R_p TABLE 3, it has been found that the external surface of the cups has higher activity and was susceptible to corrosion. It is confirmed by the topography of that part of the cup.

In the last step of the work the EIS study was conducted. The results in the form of impedance spectra enabled to identify the nature of the surface oxide on the biomaterial surface – FIG. 5 and 6. The obtained electric values determined on the basis of the recorded spectra are shown in TABLE 4.



RYS. 5. Przykładowe widma impedancyjne na wewnętrznej powierzchni panewki po implantacji:
a) wykres Nyquista, b) diagram Bode.
FIG. 5. Sample impedance spectra on internal surface for cup after implantation:
a) Nyquist graph, b) Bode's diagram.



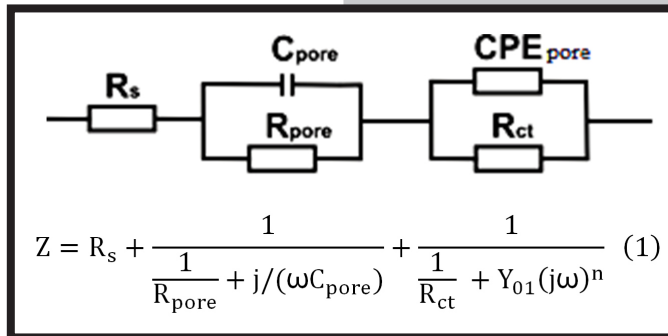
RYS. 6. Przykładowe widma impedancyjne na zewnętrznej powierzchni panewki po implantacji:
a) wykres Nyquista, b) diagram Bode.
FIG. 6. Sample impedance spectra on external surface for cup after implantation:
a) Nyquist graph, b) Bode's diagram.

TABELA 4. Wyniki elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej dla próbek z powierzchnią zewnętrzną i wewnętrzną.

TABLE 4. Results of electrochemical impedance spectroscopy for external surface and internal surface.

Powierzchnia Surface	R_s [Ω]	R_{pore} [k Ω]	C_{pore} [μ F]	CPE_{pore}		R_{ct} [k Ω]	E_{OCP} [mV]
				Y_{01} [F_s^{-n-1}/cm^2]	n		
wewnętrzna internal	17	108 (28)	248 (63)	0.0019 (0.0032)	0.79 (0.01)	579 (115)	-30 (2)
zewnętrzna external	16	136 (16)	104 (31)	0.0009 (0.0012)	0.79 (0.04)	1570 (235)	-50 (4)

Na podstawie uzyskanych wykresów dopasowano modele zastępcze, które są modelami fizycznymi opisującymi zjawiska występujące w danym obiekcie. Stwierdzono, że najlepsze dopasowanie eksperymentalnych widm impedancyjnych uzyskuje się stosując elektryczny obwód zastępczy złożony z dwóch kolejno następujących po sobie równoległych układów elementu pojemnościowego/stałowazowego połączonego z oporem przejścia i oporem przy wysokich częstotliwościach, który może być przypisany oporowi elektrolitu – RYS. 7. R_{ct} oznacza opór przeniesienia ładunku, a CPE_{pore} pojemność warstwy tlenkowej, z kolei R_{pore} i C_{pore} – opór i pojemność warstwy porowatej (1). Diagram Nyquista wyznaczony dla próbki z panewki przedstawia fragment dużych niepełnych półokręgów, który jest typową odpowiedzią impedancyjną dla cienkich warstw tlenkowych – RYS. 6a. Przedstawione na diagramach Bode, maksymalne wartości kątów przesunięcia fazowego dla próbek w szerokim zakresie częstotliwości są zbliżone i wynoszą $\theta \approx 75^\circ$. Nachylenia $\log|Z|$ w całym zakresie częstotliwości są bliskie -1, co świadczy o typowym charakterze pojemnościowym warstwy porowatej na powierzchni – RYS. 6b. Takie same schematy zastępcze dla stali 316 LVM oraz cpTi/Ti-6Al-4V otrzymani [12,13,16].



RYS. 7. Elektryczne schematy zastępcze.
FIG. 7. Electric substitute schemes.

On the basis of the obtained results equivalent circuits were proposed. The best matching of model spectra to impedance spectra was assured by the equivalent circuit composed of two parallel electric elements representing capacitive or constant of border combined with resistance transitions and resistance at high frequencies, which could be attributed to the resistance of the electrolyte – FIG. 7. Symbols describing individual elements of electric substitute circuits are marked respectively:

R_{ct} – resistance of the charge transition at phases border, CPE_{pore} – capacity of oxide layer, R_{pore} – resistance of solution in the porous layer, C_{pore} – resistance and capacity of porous layer (1). Nyquist diagrams set for the cup sample have the form of fragments of large, incomplete semicircles that have impedance response typical for thin oxide layers – FIG. 6a. Maximum values of phase displacement at a broad range of frequencies presented in Bode's diagrams are similar regardless of the type of sample, and amount to $\theta = 75^\circ$. The inclinations $\log|Z|$ at the whole scope of frequency change are close to -1 which indicates the capacity character of porous layer – FIG. 6b. The same electric substitute schemes for 316 LVM stainless steel and cpTi/Ti-6Al-4V were obtained [12,13,16].

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań nie stwierdzono wpływu przebywania panewki w środowisku korozyjnym płynów ustrojowych człowieka na jej własności fizykochemiczne. Stwierdzono, że zarówno polerowane powierzchnie wewnętrzne, jak i zewnętrzne pokryte hydroksyapatytem stanowią barierę chroniącą implant przed działaniem płynów ustrojowych, a ich działanie nie prowadzi do obniżenia biokompatybilności biomateriału panewki. Uzyskane w badaniach potencjodynamicznych parametry dla panewki po implantacji były porównywalne do wartości uzyskanych dla panewki nowej. Wyniki te potwierdzono w badaniach EIS, w których wykazano występowanie warstwy podwójnej stanowiącej dobre zabezpieczenie biomateriału metalowego przed rozwojem niekorzystnych zjawisk korozyjnych.

Conclusions

On the basis of the conducted research, it can be stated that the physicochemical properties of the cup were not changed during its stay in the body fluids. It can be stated that both, polished internal surface and external surface covered with hydroxyapatite, are efficient barrier protecting the implant from the influence of the body fluids and its usage does not lead to deterioration of biocompatibility of the cup. The parameters of potentiodynamic tests for cup after implantation were comparable to the values obtained for the new cup. The results of electrochemical impedance spectroscopy tests showed the presence of a double layer constituting good protection of biomaterials metal against the corrosion in Ringer's solution.

Stwierdzono natomiast różnice w składzie chemicznym analizowanych panewek, mieszczące się jednak w zakresie zalecanym przez normę ISO 5832-9. Niemniej jednak różnice te przyczyniły się do uzyskania zróżnicowanych wartości twardości dla analizowanych implantów. Zaobserwowano, że dla panewki po implantacji w obszarze „II” (RYS. 2) zwiększyła się wartość twardości w stosunku do obszaru „I”, co świadczy o jej umocnieniu wynikającym ze sposobu jej obciążania podczas użytkowania.

Dodatkowo przeprowadzone obserwacje makroskopowe potwierdzają przyczynę alloplastyki rewizyjnej, która została przeprowadzona w wyniku zwiczenia panewki spowodowanej brakiem osteointegracji kości z zewnętrzną powierzchnią panewki pomimo obecności hydroksyapatytu. Po 68-miesięcznym czasie przebywania w organizmie stwierdzono lokalnie występujący hydroksyapatyt, który jest skutkiem nierównomiernej resorpcji podczas stabilizacji, co mogło być spowodowane nieprawidłowym przyleganiem implantów do kości.

Podziękowania

Praca została sfinansowana ze środków Katedry Biomateriałów i Inżynierii Wyrobów Medycznych Wydziału Inżynierii Biomedycznej Politechniki Śląskiej.

On the other hand, differences in the chemical composition of the analyzed cups were stated, but the values were still within the range recommended by ISO 5832-9 standards. However, these differences contributed to the different hardness values for the analyzed implants. It was observed that for the cup after implantation hardness value increased in area “II” (FIG. 2) against area “I”, which testifies its hardening.

Moreover, the macroscopic observations confirm the reason for revision arthroplasty, which was carried out as a result of the dislocation caused by the lack of osseointegration of the external surface of the cup despite the presence of the hydroxyapatite. After 68 months of implantation, local presence of hydroxyapatite was observed which was the result of irregular resorption during stabilization, which could have been caused by an inappropriate contact of the implants to the bone.

Acknowledgements

The project was funded by the Department of Biomaterials and Medical Devices Engineering, Faculty of Biomedical Engineering, Silesian University of Technology.

Pismienictwo

- [1] Semenowicz J., Mrocza A., Kajzer A., Kajzer W., Koczy B., Marciniak J.: Total hip arthroplasty using cementless Avantage cup in patients with risk of hip prosthesis instability. *Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja* 16(3) (2014) 253-263.
- [2] Cieślak M., Mlekodaj K., Janus A.M., Łojewski T., Engvall K., Kotarba A.: Badania powierzchni panewki stawu biodrowego po dziesięciu latach kontaktu z organizmem. *Engineering of Biomaterials* 89-91 (2009) 54-56.
- [3] Senthil Maharaj P.S.R., Maheswaran R., Vasanthanathan A.: Numerical Analysis of Fractured Femur Bone with Prosthetic Bone Plates. *Procedia Engineering* 64 (2013) 1242-1251.
- [4] Hutnik A., Świeczko-Żurek B., Szumlański A., Serbiński W.: Metal implants in osteosynthesis – construction solutions, materials and applications. *Engineering of Biomaterials* 115 (2012) 7-11.
- [5] Wendland J., Gierzyńska-Dolna M., Rybak T., Wiśniewski T., Rajchel B.: Badania nad opracowaniem nowego biomateriału przeznaczonego na elementy endoprotez stawu biodrowego. *Obróbka Plastyczna Metali* 2 (2009) 3-19.
- [6] Pereda M.D., Kang K.W., Bonetto R., Llorente C., Bilmes P., Gervasi C.: Impact of surface treatment on the corrosion resistance of ASTM F138-F139 stainless steel for biomedical applications. *Procedia Materials Science* 1 (2012) 446-453.
- [7] Zieliński A., Świeczko-Żurek B., Sobieszczyk S.: Estimation of the expected effects of different surface modifications on mechanical, chemical and biological behaviour of endoprostheses. *Engineering of Biomaterials* 58-60 (2006) 217-219.
- [8] Standard: ISO 5832-9:2007: Implants for surgery - Metallic materials - Part 9: Wrought high nitrogen stainless steel.

References

- [9] Standard: EN ISO 6507-7:2005: Metallic materials. Vickers hardness test. Test method.
- [10] Standard: PN-EN ISO 10993-15:2009: Biologiczna ocena wyrobów medycznych - Część 15: Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów.
- [11] Trzaska M., Trzaska Z.: Elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna w inżynierii materiałowej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2010.
- [12] Walke W., Paszenda Z., Basiaga M., Karasiński P., Kaczmarek M.: EIS study of SiO₂ Oxide Film on 316L stainless steel for cardiac implants. *Information Technologies in Biomedicine. Advances in Intelligent Systems and Computing* 284. Springer (2014) 403-410.
- [13] Basiaga M., Paszenda Z., Walke W., Karasiński P., Marciniak J.: Electrochemical Impedance Spectroscopy and corrosion resistance of SiO₂ coated cpTi and Ti-6Al-7Nb alloy. *Information Technologies in Biomedicine. Advances in Intelligent Systems and Computing* Springer 284 (2014) 411-420.
- [14] Kajzer A., Kajzer W., Semenowicz J., Mrocza A.: Corrosion Resistance of Hip Endoprosthesis Cups in the Initial State and After Implantation. *Solid State Phenomena* 227 (2015) 523-526.
- [15] Kajzer A., Kajzer W., Dzielicki J., Matejczyk D.: The study of physicochemical properties of stabilizing plates removed from the body after treatment of pectus excavatum. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 2 (2015) 35-44.
- [16] Silva E.F., C.Oliveira L.F.: Avaliação da resistência à corrosão de implantes em aços inoxidáveis ISO 5832-9 e F138 removidos de pacientes. *Quim. Nova*. 35 (2012) 59-65.

HYDROŻELE ALGINIANOWE SIECIOWANE JONOWO I KOWALENCYJNIE

JOANNA WALCZAK, JAKUB MARCHEWKA, JADWIGA LASKA*

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

Streszczenie

W niniejszej pracy zaprezentowano metodę otrzymywania mikrosfer hydrożelowych o podwyższonej wytrzymałości mechanicznej. Alginian sodu w formie mikrosfer hydrożelowych poddano sieciowaniu jonowemu i kowalencyjnemu. Sieciowanie przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszym etapie alginian sodu usieciowano jonowo poprzez wymianę jednowartościowych kationów sodu na dwuwartościowe kationy wapnia. W zależności od stężenia chlorku wapnia otrzymano różne formy hydrożelu, od bezkształtnego żelu do gęstych aglomeratów mikrosfer. By uzyskać wyższą wytrzymałość mechaniczną jonowo usieciowanego hydrożelu, dodatkowo poddawano go reakcji z epichlorohydriną. Reakcja ta pozwoliła wprowadzić pomiędzy łańcuchy alginianu mostki kowalencyjne. Otrzymano również usieciowane mikrosfery alginianowe zmodyfikowane włóknami celulozy, które stanowiły dodatkowe wzmocnienie mechaniczne. Zbadano wpływ stopnia usieciowania na absorpcję wody przez suche próbki. Morfologię otrzymanych mikrosfer obserwowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Rozkład jonów wapnia w próbkach oceniono przy użyciu spektroskopii z dyspersją energii. Zbadano także degradację mikrosfer in vitro w płynie PBS.

Słowa kluczowe: hydrożele, mikrosfery alginianowe, sieciowanie, celuloza

[Inżynieria Biomateriałów 132 (2015) 17-23]

Wstęp

Hydrożele są materiałami składającymi się z hydrofilowych polimerów wykazujących wysoką zdolność absorpcji i utrzymywania wody. Absorpcja wody jest podstawową właściwością wpływającą na parametry mechaniczne materiału, zdolność do uwalniania leków wewnątrz organizmu czy biogodność. W celu utrzymania konsystencji i zapobiegania rozpuszczaniu w fazie wodnej hydrożele są poddawane procesowi sieciowania, w którym tworzą się jonowe lub kowalencyjne mostki [1]. Właściwości mechaniczne oraz zdolności do absorpcji wody silnie zależą od budowy chemicznej polimeru oraz stopnia jego usieciowania.

Alginiany są naturalnie występującymi polisacharydami zawierającymi reszty kwasu β -D-mannuronowego oraz kwasu α -L-guluronowego połączone razem wiązaniami glikozydowymi. Alginiany charakteryzują się wysoką biogodnością, biodegradowalnością i łatwością przetwarzania. W prezentowanej pracy usieciowane hydrożelowe mikrosfery alginianowe otrzymano przez sieciowanie jonowe i kowalencyjne. Sieciowanie jonowe hydrożelu alginianowego jest możliwe poprzez oddziaływanie dwuwartościowych kationów z grupami karboksylowymi alginianu obecnymi w resztach guluronowych.

HYDROGELS BASED ON IONICALLY AND COVALENTLY CROSSLINKED ALGINATES

JOANNA WALCZAK, JAKUB MARCHEWKA, JADWIGA LASKA*

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

Abstract

In this work a method of formation of hydrogel beads with increased mechanical durability is presented. Sodium alginate in the form of hydrogel beads was modified by ionic and covalent crosslinking. The crosslinking was achieved in two steps. In the first step, sodium alginate was ionically crosslinked by the ionic exchange of monovalent sodium cations with bivalent calcium cations. Different forms of the crosslinked alginate were obtained depending on the calcium chloride concentration. The forms varied from shapeless gel to hard agglomerated spheres. To increase mechanical durability of the ionically crosslinked alginate it was subjected to the reaction with epichlorohydrin. The reaction allowed to introduce covalent bridges between alginate chains. For additional reinforcement the crosslinked beads of alginate were modified with cellulose nanofibers. Dependence of water absorption in the dry samples on the crosslinking level was observed. Morphology of the beads was observed with the use of scanning electron microscopy. Calcium ions distribution in the samples was evaluated by energy dispersive spectroscopy analysis. In vitro degradation of the crosslinked alginates was also investigated.

Keywords: hydrogels, alginate beads, crosslinking, cellulose

[Engineering of Biomaterials 132 (2015) 17-23]

Introduction

Hydrogels are materials composed of hydrophilic polymers showing high ability to absorb and retain water. Water absorption is essential property influencing mechanical properties of the material, ability to release drugs inside the organism and its biocompatibility. In order to maintain the consistence of hydrogels and prevent their dissolution in aqueous media they are subjected to crosslinking process, in which ionic or covalent crosslinks are formed [1]. The mechanical properties and water absorption ability strongly depend on the chemical structure of the polymer and the degree of its crosslinking.

Alginates are naturally occurring polysaccharides consisting of β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid linked together by glycosidic bond. Alginates are known for their high biocompatibility, biodegradability and easiness of processing. In the presented work crosslinked alginate hydrogel beads were obtained by the ionic and covalent crosslinking. Ionic crosslinking can be achieved by interaction of divalent cations with alginate carboxyl groups in guluronic blocks.

Kationy wapnia dyfundowały do roztworu alginianu sodu tworząc żel charakteryzujący się gradientem stężenia tych jonów w materiale. Zastosowanie sieciowania kowalencyjnego alginianu stanowi efektywny sposób polepszenia biostabilności mikrosfer w środowisku fizjologicznym [2,3].

Alginian w formie usieciowanych mikrosfer może być stosowany jako układ do kontrolowanego uwalniania leków czy komórek w inżynierii tkankowej. Alginiany w różnej formie znajdują zainteresowanie w wielu dziedzinach nauki. W formie włókien i hydrożeli są szeroko stosowane jako materiały opatrunkowe, jak również przy regeneracji tkanki chrzęstnej. Ponadto hydrożele dzięki wysokiemu powinowactwu do wody oraz właściwościom mechanicznym podobnym do tkanek miękkich, mogą być z sukcesem używane do konstrukcji rusztowań wspierających i ułatwiających wzrost, namnażanie i różnicowanie komórek. W ostatnich badaniach usieciowane mikrosfery alginianowe zostały zastosowane także do regeneracji tkanki nerwowej [4].

Materiały i metody

Sól sodową kwasu alginowego, epichlorohydrinę (≥99%) oraz celulozę w formie średnich włókien zakupiono w Sigma Aldrich, Niemcy. Chlorek wapnia (bezwodny, ≥99,9%), alkohol etylowy (bezwodny, 99,8%), wodorotlenek sodu (bezwodny, ≥99,9%) i kwas azotowy(V) (65%) zakupiono w POCH, Polska.

Alginian sodu usieciowano jonowo poprzez działanie roztworem chlorku wapnia. W tym celu alginian sodu (1,5 g) rozpuszczono w wodzie destylowanej (75 ml) oraz przygotowano roztwory chlorku wapnia o różnych stężeniach molowych (0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 i 0,7 M). Roztwór alginianu sodu dodawano kroplami do roztworu chlorku wapnia poprzez strzykawkę z igłą o średnicy 0,9 mm. Uformowane mikrosfery alginianowe pozostawiano w roztworze na 24 h. Na końcu produkt odsączano, przemywano wodą destylowaną i suszono w temp. 45°C.

Otrzymane mikrosfery alginianowe dodatkowo sieciowano kowalencyjnie epichlorohydriną. W tym celu 1 g mikrosfer alginianowych wprowadzono do 30 ml mieszaniny etanol/woda (60% v/v). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 0,729 ml (2 eq) epichlorohydriny. 1 M roztwór wodorotlenku sodu dodawano kroplami, aż do osiągnięcia pH 13. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 90 minut w temperaturze pokojowej. Następnie ostrożnie dodano stężony kwas azotowy(V) w celu zneutralizowania zasady sodowej, produkt odsączono, przemyto wodą destylowaną i wysuszono w temp. 45°C.

Alginiany modyfikowane celulożą otrzymano przez dodatek włókien celulozowych podczas sieciowania jonowego. Nanowłókna celulozy wprowadzono do 75 ml wody destylowanej i mieszano aż do wytworzenia jednorodnej zawiesiny. Następnie dodawano odpowiednią ilość alginianu sodu i mieszano aż do jego rozpuszczenia. Stosunki wagowe celulozy do alginianu sodu wynosiły 25:75, 40:60, 50:50 i 70:30. Efektywne mieszanie uzyskiwano poprzez zastosowanie homogenizatora ultradźwiękowego SONICS Vibra-Cell (Sonics and Materials, USA). Sieciowanie jonowe z zastosowaniem 0,1 M roztworu chlorku wapnia i kolejne sieciowanie kowalencyjne epichlorohydriną przeprowadzono tak jak opisano powyżej.

Próbki scharakteryzowano z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej na aparaturze Nova NanoSEM 200 (FEI, Holandia) i spektroskopii z dyspersją energii z zastosowaniem detektora (EDAX, USA). Biodegradację in vitro badano poprzez inkubację próbek w PBS w temperaturze 37°C w inkubatorze INE 400 (Mettler, Niemcy). Mierzono okresowo zmiany pH i przewodności roztworu.

In the described research, calcium cations diffused into the sodium alginate beads producing gel with a concentration gradient of the ions across the bead. Implemented in this study additional covalent crosslinking in ionically crosslinked alginates, is an effective strategy to improve biostability of the alginate beads in physiological media [2,3].

Alginate in the form of crosslinked beads can be applied as a system for controlled release of therapeutic agents or cell release in the tissue engineering. In the form of fibers and hydrogels, alginates are widely applied as a wound dressing materials, and in cartilage tissue regeneration. Moreover, hydrogels thanks to their high affinity to water, and their mechanical properties similar to soft tissue, can be successfully used in the scaffold construction to support and facilitate cells growth, proliferation and differentiation. In the recent study crosslinked alginate beads were used in the nervous tissue regeneration [4].

Materials and Methods

Alginic acid sodium salt, epichlorohydrin (≥99%) and cellulose in the form of medium fibers were purchased from Sigma Aldrich, Germany. Calcium chloride (anhydrous, ≥99.9%), ethyl alcohol (anhydrous, 99.8%), sodium hydroxide (anhydrous, ≥99.9%) and nitric(V) acid (65%) were purchased from POCH, Poland.

Sodium alginate was ionically crosslinked by treatment with a calcium chloride solution. For this, sodium alginate (1.5 g) was dissolved in distilled water (75 ml), and the calcium chloride solutions of various concentrations, i.e., 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5 and 0.7 M, were prepared. The sodium alginate solution was added to a calcium chloride solution via syringe with the needle diameter of 0.9 mm. Alginate beads were formed, and left over 24 h in the solution. Finally the product was filtered, washed with distilled water and dried at 45°C.

The obtained alginate beads were additionally crosslinked covalently with epichlorohydrin. For this, 1 g of the alginate beads was immersed in 30 ml of the ethanol/water mixture (60% v/v). Next 0.729 ml (2 eq) of the epichlorohydrin was added to the reaction vessel. A 1 M solution of sodium hydroxide was added dropwise until pH of 13 was obtained. The reaction mixture was stirred for 90 minutes at room temperature. Then concentrated nitric(V) acid was carefully added to neutralize the base. Finally the product was filtered, washed with distilled water and dried at 45°C.

Cellulose modified alginates were produced by addition of the cellulose nanofibers during the ionic crosslinking process. Cellulose nanofibers were introduced into 75 ml of distilled water and stirred magnetically until uniform suspension was created. Then an appropriate amount of sodium alginate was added and stirred until dissolved. Weight ratios of cellulose to sodium alginate were: 25:75, 40:60, 50:50 and 70:30. Effective mixing of the components was achieved by sonication with ultrasonic homogenizer SONICS Vibra-Cell (Sonics and Materials, USA). The ionic crosslinking with the use of 0.1 M solution of calcium chloride, as well as the subsequent covalent crosslinking with epichlorohydrin were carried out as described above.

Characterization of the samples was performed with scanning electron microscopy, with the use of Nova NanoSEM 200 (FEI, Netherlands), and the energy dispersive spectroscopy analysis with EDS detector (EDAX, USA). In vitro degradation was examined by incubating the samples in PBS at 37°C in INE 400 incubator (Mettler, Germany). Changes in pH and conductivity of the solutions were measured periodically.

Wyniki i dyskusja

Proces stopniowego sieciowania jonowego alginianu sodu jest możliwy poprzez wymianę jonów sodu na jony wapnia. Podczas gdy każdy kation Na^+ oddziałuje tylko z jedną grupą karboksylową łańcucha alginianowego, kation Ca^{2+} wiąże się jonowo z dwoma grupami karboksylowymi pochodzącymi z różnych łańcuchów polimeru jak pokazano na RYS. 1.

Wymiana Na^+ w alginianie sodu na Ca^{2+} jest stosunkowo łatwa i zachodzi gdy wodny roztwór NaAlg zostaje zmieszany z roztworem CaCl_2 . W niniejszej pracy roztwór alginianu sodu wkraplano do roztworu chlorku wapnia. Tak otrzymane mikrosfery alginianowe mogą służyć np. jako nośniki leków. W zależności od stężenia zastosowanego roztworu chlorku wapnia produkty sieciowania jonowego różniły się właściwościami fizycznymi. Efektem zastosowania roztworu chlorku wapnia o stężeniu mniejszym niż 0,05 M były mikrosfery bardzo miękkie, nie dające się rozdzielić, z kolei stężenie powyżej 0,7 M powodowało aglomeraty twardych mikrosfer również trudnych do rozdzielania. Oddzielne, regularne mikrosfery otrzymano dla stężeń roztworów w zakresie 0,075-0,5 M (RYS. 2). Ilość uzyskiwanego hydrożelu malała wraz ze wzrastającym stężeniem chlorku wapnia (RYS. 3), podczas gdy twardość mikrosfer rosła.

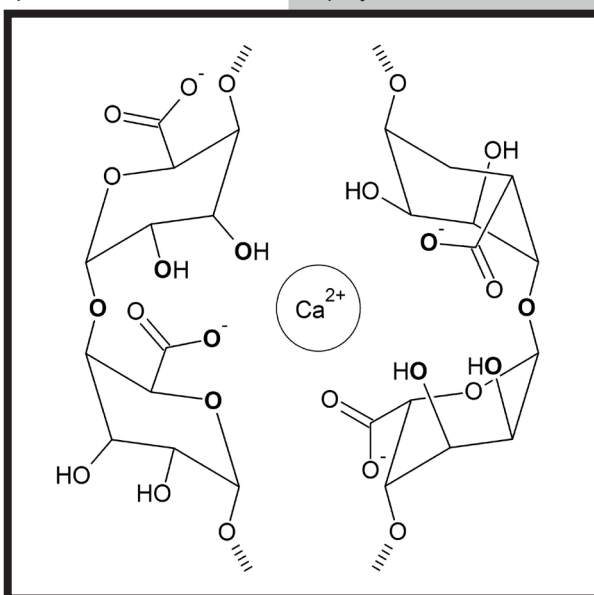
Wzrost twardości jest konsekwencją wzrostu stopnia usieciowania alginianu wraz ze wzrostem stężenia CaCl_2 .

Zmniejszenie wydajności sieciowania wraz ze wzrostem stężenia CaCl_2 wiąże się prawdopodobnie z szybką wymianą jonów na powierzchni kropli, co uniemożliwia wnikanie kationów wapnia do jej wnętrza. Jako, że alginian wapnia jest trudno rozpuszczalny w wodzie, tak usieciowane mikrosfery są relatywnie stabilne i mogą być z powodzeniem stosowane jako hydrożele, jednak w wielu zastosowaniach wskazana jest wyższa wytrzymałość mechaniczna. Ponadto wiązania jonowe stosunkowo łatwo ulegają zerwaniu w rozpuszczalnikach polarnych, a mikrosfery hydrożelowe szybko tracą swoje właściwości, nie zachowują sferycznego kształtu i zbyt szybko rozpuszczają się. W związku z tym przeprowadzono dodatkowe sieciowanie kowalencyjne w obrębie mikrosfer.

Tworzenie mostków kowalencyjnych pomiędzy łańcuchami alginianu opierało się na otwarciu pierścienia grupy oksiranowej w cząsteczkach epichlorohydryny i reakcji chemicznej z grupami hydroksylowymi cząsteczek alginianu. Otwarcie pierścienia oksiranowego katalizowane jest przez wodorotlenek sodu, jak to schematycznie pokazano na RYS. 4. Reakcja zachodziła w temperaturze pokojowej. Wydajność procesu była wysoka (do 95%), jednak podobnie jak dla sieciowania jonowego, malała ze wzrastającym stężeniem chlorku wapnia w sieciowaniu jonowym, co pokazano na RYS. 3.

Results and Discussions

The process of progressive ionic crosslinking of sodium alginate is possible by an exchange of sodium cations with the calcium ones. While every Na^+ interacts with only one carboxyl group of the alginate chain, the Ca^{2+} ionically bonds with two carboxyl groups most likely originating from different polymer chains as shown in FIG. 1.



RYS. 1. Struktura chemiczna łańcuchów alginianowych po sieciowaniu jonowym w roztworze chlorku wapnia.

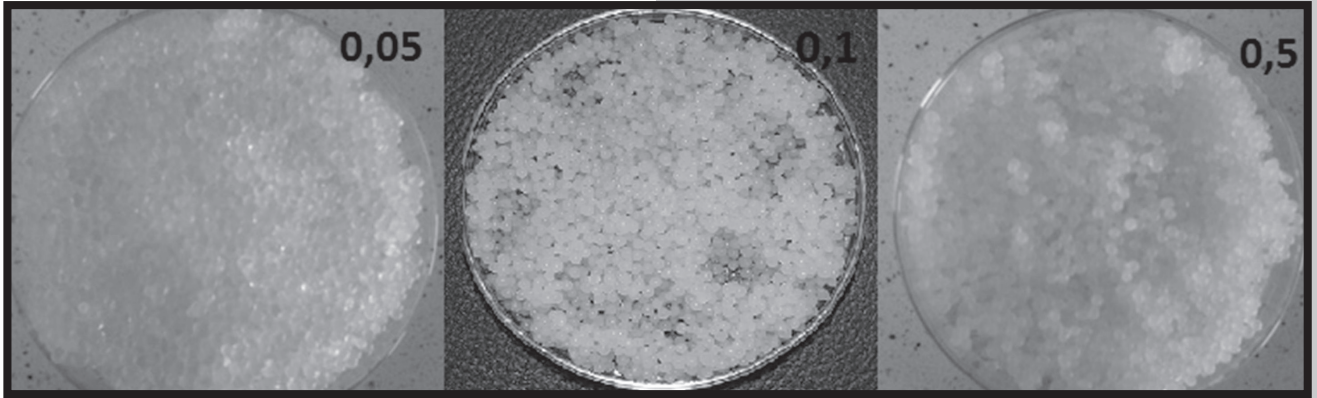
FIG. 1. Chemical structure of the alginate chains after ionic crosslinking in calcium chloride solution.

The exchange of the Na^+ ions in the sodium alginate for Ca^{2+} is relatively easy, and occurs while aqueous solution of NaAlg is mixed with a CaCl_2 solution. In this work a sodium alginate solution was added in the form of droplets to a solution of calcium chloride. It is a known method of producing alginate beads, which can be used, for example, as a drug delivery system. Depending on the concentration of the applied calcium chloride solutions the products of ionic crosslinking were varying with their physical properties. The alginate beads resulting from the use of calcium chloride solution of concentration ≤ 0.05 M formed a very soft beads impossible to separate from each other, while when the concentration was 0.7 M or higher a hard block of agglomerated spheres was formed, also hard to separate. Separate regular beads were produced for CaCl_2 concentra-

tions in the range of 0.075-0.5 M (FIG. 2). The amounts of the hydrogel beads decreased with the increase in the calcium chloride concentration (FIG. 3), while the hardness of the beads increased. Higher hardness of the beads is the result of the higher degree of crosslinking caused by higher concentrations of CaCl_2 .

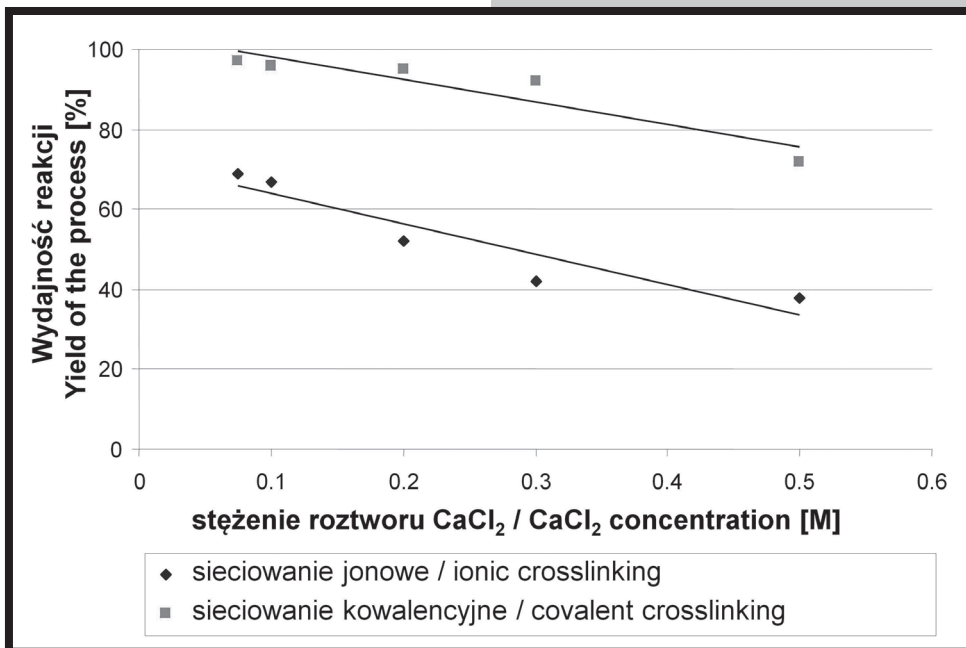
Decrease in crosslinking yield together with an increase in CaCl_2 concentration is most probably caused by a quick exchange of the ions on the surface of a droplet. A shell of the crosslinked alginate is created and the calcium cations are not able to penetrate into the droplets. As calcium alginate is slightly soluble in water such crosslinked beads can be successfully applied, however in many cases higher mechanical strength is awaited. Moreover, the ionic bonding is sensitive to polarity of solvents, including water, and the hydrogel beads lose their properties, do not keep their spherical shape additional and dissolve too rapidly. Taking all these into account additional covalent crosslinking in the beads was performed.

The creation of the covalent linkages between alginate chains was based on opening the oxirane rings in the epichlorohydrin molecules and a subsequent chemical reaction with hydroxyl groups of alginate molecules. Opening an oxirane ring is catalyzed with sodium hydroxide as it is schematically shown in FIG. 4. The reaction occurred at room temperature. The yield was high (up to 95%), however, similarly as in the case of ionic crosslinking, it also decreased with increasing calcium chloride concentration, which is shown in FIG. 3.



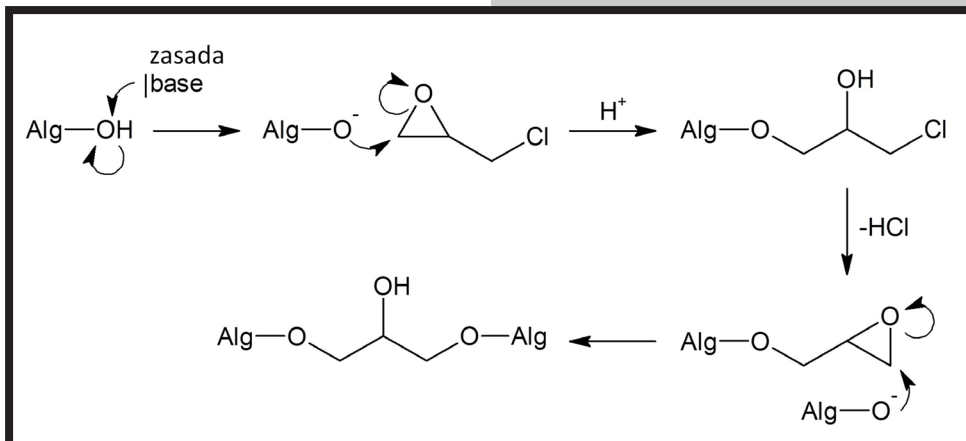
RYS. 2. Mikrosfery alginianowe otrzymywane poprzez wkraplanie roztworu alginianu sodu do roztworu chlorku wapnia o stężeniach 0,05, 0,1 oraz 0,5 M.

FIG. 2. Alginate beads produced by adding drop by drop of the sodium alginate solution to the calcium chloride solutions of concentrations 0.05, 0.1 and 0.5 M.



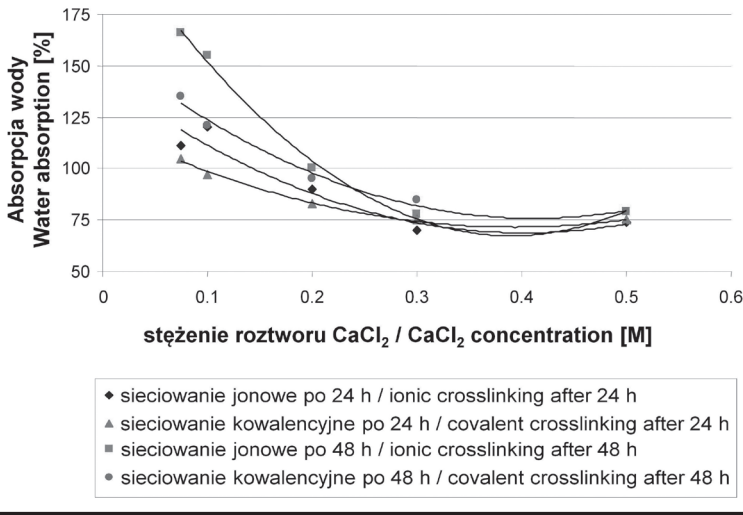
RYS. 3. Wydajność sieciowania jonowego i kowalencyjnego w zależności od stężenia roztworu chlorku wapnia.

FIG. 3. Yield of the ionic and covalent crosslinking processes vs. concentration of the CaCl₂ solution.



RYS. 4. Mechanizm sieciowania kowalencyjnego z udziałem epichlorohydryny.

FIG. 4. Mechanism of covalent crosslinking with epichlorohydrin.



RYS. 5. Absorpcja wody przez mikrosfery alginianowe usieciowane jonowo i kowalencyjnie.

FIG. 5. Water absorption in ionically and covalently crosslinked alginate beads.

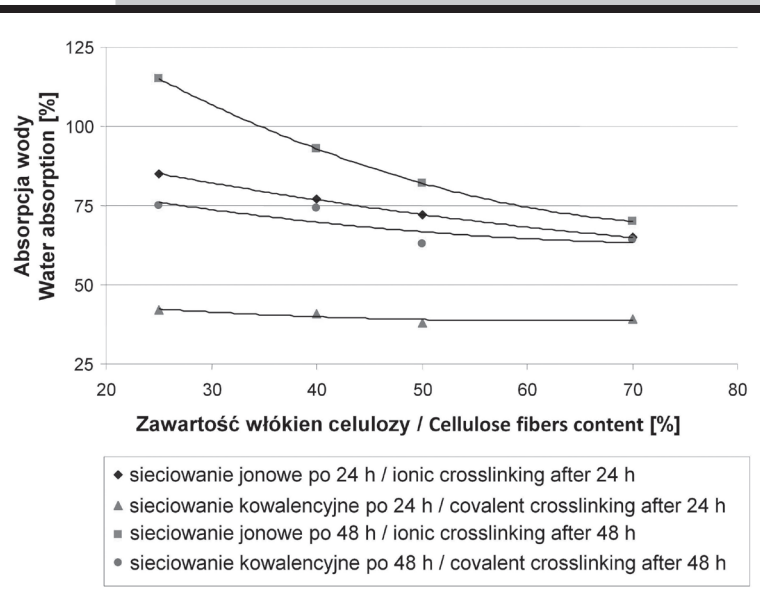
Istotnym parametrem charakteryzującym hydrożel jest ilość pochłanianej wody. Uzyskane mikrosfery alginianowe, sieciowane jonowo i kowalencyjnie, porównano poprzez wprowadzenie wysuszonych preparatów do wody destylowanej na 24 i 48 h. Absorpcję wody określono poprzez wzrost masy w stosunku do masy suchego preparatu. Absorpcja wody zależy od stopnia usieciowania i wraz z jego wzrostem maleje. Wyniki chłonności wody dla usieciowanych jonowo i kowalencyjnie mikrosfer alginianowych pokazano na RYS. 5. Stopień usieciowania wyrażono pośrednio stężeniem roztworu chlorku wapnia. Wyraźny spadek absorpcji wody występuje w próbkach otrzymanych z udziałem roztworów chlorku wapnia o stężeniach poniżej 0,3 M. W wypadku mikrosfer otrzymywanych w roztworze CaCl₂ o stężeniu wyższym niż 0,3 M – absorpcja wody utrzymywała się na podobnym poziomie. Zależność tę obserwowano zarówno dla mikrosfer usieciowanych jonowo i kowalencyjnie oraz zarówno po 24 h i 48 h. Poniżej stężenia CaCl₂ 0,3 M absorpcja wody w mikrosferach usieciowanych kowalencyjnie była znacząco niższa niż w mikrosferach sieciowanych jonowo, natomiast w przypadku mikrosfer otrzymywanych w roztworach CaCl₂ o stężeniach $\geq 0,3$ M chłonność wody po 48 h w mikrosferach sieciowanych kowalencyjnie była najwyższa (RYS. 5). Trzeba tu jednak dodać, że dla tych mikrosfer różnice w absorpcji wody nie są bardzo duże i mieszczą się w zakresie ok. 75% suchej masy mikrosfer.

Dla dodatkowego wzmocnienia mikrosfery alginianowe zmodyfikowano nanowłóknami celulozy zgodnie z opisem podanym w rozdziale *Materiały i metody*. W tym wypadku absorpcja wody malała wraz ze wzrostem zawartości nanododatku (RYS. 6). We wszystkich rodzajach mikrosfer modyfikowanych celulozą chłonność wody jest niższa niż w analogicznych próbkach nie zawierających celulozy. Mikrosfery sieciowane kowalencyjnie mają wyraźnie niższą chłonność wody i nawet te otrzymywane przy niskich stężeniach CaCl₂ wykazują chłonność wody na poziomie 75%. W tym wypadku chłonność wody praktycznie nie zależy od pierwotnego stężenia chlorku wapnia. Tak wyraźna zmiana zachowania hydrożelu wymaga jeszcze wyjaśnienia.

A very important factor describing a hydrogel is water absorption. The obtained alginate beads, ionically and covalently crosslinked, were investigated for water absorption by immersing them in distilled water for 24 and 48 h. Water intake was determined by weight raise in relation to initial mass of a dry product. It could be observed, that the water absorption depends on the calcium chloride concentrations, and in consequence on the degree of crosslinking. The higher the crosslinking degree the lower water absorption. The results for ionically and covalently crosslinked alginate beads are shown in FIG. 5. Clearly visible decrease in water absorption occurs in the samples produced with the use of calcium chloride solutions with the concentration less than 0.3 M. For the concentrations higher than 0.3 the water absorptions is similar. This tendency was observed for the beads crosslinked both ionically and covalently as well as for those immersed for 24 and 48 h. Below the 0.3 M concentration of CaCl₂ the water absorption was significantly lower in the covalently crosslinked beads, while for the concentrations ≥ 0.3 M the water intake in the covalently crosslinked beads was the highest (FIG. 5).

It should be noticed, however, that in this case the differences between the samples are not substantial and the water intake is in the vicinity of 75% of the dry sample.

For additional mechanical reinforcement the beads were loaded with cellulose nanofibers as described in the chapter *Materials and Methods*. In the case of such modified beads the water absorption decreased with the increase in the cellulose nanofibers content (FIG. 6). All the samples containing cellulose nanofibers exhibit lower water absorption than their analogues without the cellulose addition. The beads covalently crosslinked show significantly lower water intake, and even these obtained with the low concentrations CaCl₂ solutions have the water absorption at the level of 75%. In this case the water absorption is independent on the crosslinking degree. Such a different behavior of the samples containing and not containing cellulose nanofibers still needs explanation.

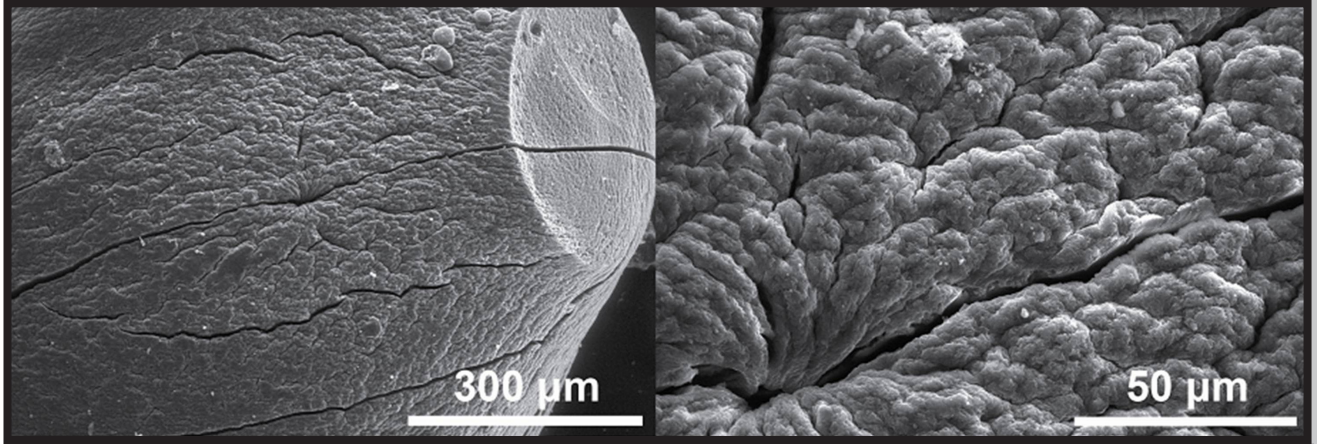


RYS. 6. Absorpcja wody przez mikrosfery alginianowe modyfikowane celulozą usieciowane jonowo i kowalencyjnie.

FIG. 6. Water absorption in ionically and covalently crosslinked alginate beads modified with cellulose.

Morfologia powierzchni wszystkich mikrosfer alginianowych niezależnie od stopnia usieciowania była bardzo podobna. Przykładowe obrazy SEM pokazano na RYS. 7. Ukazują one wysoką chropowatość powierzchni. Spłaszczenie jest rezultatem stykania się mikrosfer wzajemnie ze sobą bądź z powierzchnią podczas suszenia. Wzmocnienie mikrosfer celulozą pozwala otrzymać mikrosfery o niezaburzonym kształcie.

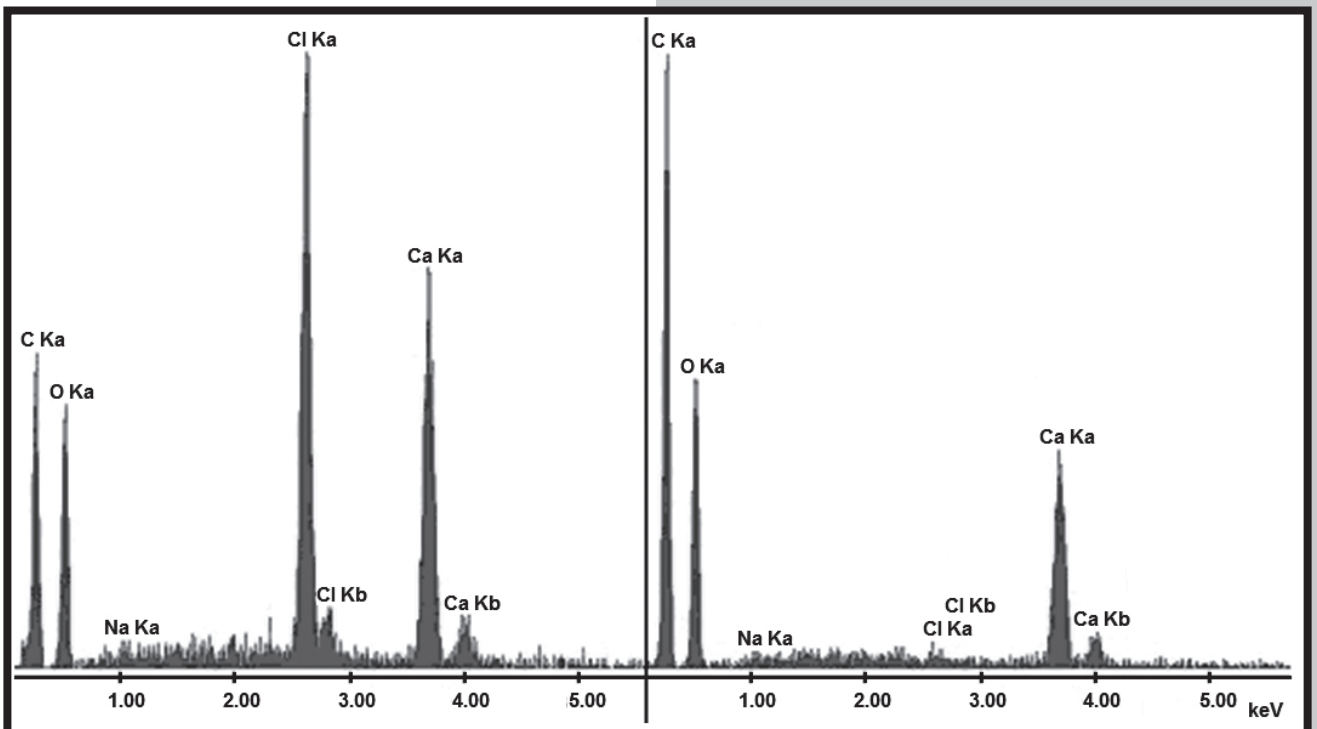
Morphology of the surface of all alginate beads independently on the crosslinking density was very similar. The exemplary SEM images are shown in FIG. 7. They show high roughness of the surface of the beads. The flatness is a result of contiguousness of the beads to each other or to the substrate during drying. Reinforcement of the beads with cellulose allowed to obtain the spheres of undisturbed shape.



RYS. 7. Morfologia powierzchni mikrosfer alginianowych po sieciowaniu jonowym i kowalencyjnym.
FIG. 7. The morphology of the surface of alginate beads after ionic and covalent crosslinking.

Na RYS. 8. pokazano analizę elementarną uzyskaną metodą EDS. Produkt usieciowany jonowo zawiera znaczną ilość jonów wapnia oraz niewielkie ilości jonów sodu, po sieciowaniu kowalencyjnym zawartość obu rodzajów jonów jest zauważalnie niższa. Jest to zrozumiałe gdyż kationy mogą być rugowane z pomiędzy łańcuchów podczas reakcji epichlorohydriny z cząsteczkami alginianu. Reakcja jest prowadzona w roztworze wodno-alkoholowym, co wzmacnia wymywanie nadmiaru CaCl_2 .

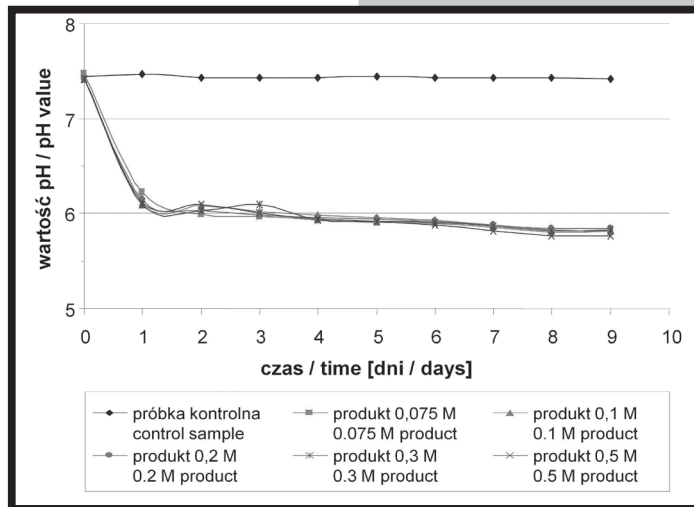
In FIG. 8 qualitative elemental analysis obtained with the energy dispersive spectroscopy is shown. The ionically crosslinked product still contains significant amounts of calcium ions and certain amount of sodium ions, while after covalent crosslinking the contents of these elements are lower. It is understandable as the cations can be removed from the interchain space during the reaction with epichlorohydrin with alginate molecules. Moreover, the reaction is carried out in water-alcohol solution what facilitates the exclusion of the excess of CaCl_2 .



RYS. 8. Analizy EDS produktów po sieciowaniu jonowym (z lewej) i kowalencyjnym (z prawej).
FIG. 8. The EDS analysis of the product after ionic crosslinking (left) and covalent crosslinking (right).

Proces degradacji *in vitro* zbadano poprzez inkubację 200 mg próbki w 20 ml buforu PBS przez 14 dni w temperaturze 37°C. Zmiana wartości pH jest bezpośrednio związana ze stopniem degradacji i tworzeniem kwasów karboksylowych. Jak pokazano na RYS. 9. najbardziej intensywna degradacja zachodzi podczas pierwszego dnia inkubacji. Następnie zmiany pH są nieznaczne. Dla wszystkich produktów obserwacje były bardzo podobne.

The *in vitro* degradation process was examined by incubating 200 mg a sample in 20 ml of PBS buffer for 14 days at 37°C. The pH value change is directly connected with the degree of the biodegradation. As it is shown in the FIG. 9 the most intense degradation occurred during the first day of the incubation. Then the pH changes were insignificant. For all of the products the observations were very similar.



RYS. 9. Zmiany wartości pH podczas degradacji *in vitro* mikrosfer alginianowych w płynie PBS.
FIG. 9. pH value changes during *in vitro* degradation in the PBS buffer.

Wnioski

W badaniach otrzymano mikrosfery charakteryzujące się różną twardością odpowiadającą stopniowi usieciowania. Reakcje sieciowania przeprowadzono na dwa sposoby - jonowo i kowalencyjnie. Mikrosfery alginianowe wzmocniono również przez dodatek włókien celulozy. Zbadano absorpcję wody w suchych produktach. Stwierdzono, że absorpcja wody jest ściśle związana ze stopniem usieciowania. Próbki słabo usieciowane otrzymywane w roztworze o stężeniu poniżej 0.1 M CaCl₂ charakteryzowały się wysoką chłonnością wody aż do 150% masy suchego alginianu, podczas gdy próbki otrzymywane przy stężeniu CaCl₂ 0.3 M lub wyższym absorbowały wodę na poziomie 75% masy alginianu. Próbki dodatkowo sieciowane kowalencyjnie również charakteryzowały się wyraźnie niższą chłonnością wody w porównaniu do analogicznych sieciowanych tylko jonowo. Próbki scharakteryzowano ponadto za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej oraz spektroskopii z dyspersją energii.

Podziękowania

Autorzy serdecznie dziękują Narodowemu Centrum Nauki (Polska) za wsparcie finansowe (grant nr 2011/01/B/STB8/07795).

Conclusions

The beads possessing various hardness corresponding to the degree of the crosslinking were fabricated. Crosslinking was conducted by two ways - ionically and covalently. The alginate beads were additionally reinforced by addition of cellulose fibers. The water absorption in the products was investigated. It strongly depends on the density of crosslinking. For samples obtained in the CaCl₂ solution of the lowest concentration (0.1 M) the water absorption was almost twice of the dry alginate mass while in the samples obtained in the solutions of 0.3 M and higher concentration it was three times lower. Analogously, the water uptake in ionically bonded alginates was significantly higher than in those additionally crosslinked by covalent intermolecular bonding. The samples were characterized with scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the National Science Center (Poland) for financial support (grant no. 2011/01/B/STB8/07795).

Pismienictwo

- [1] Jejurikar A., Lawrie G., Martin D, Grøndahl L.: A novel strategy for preparing mechanically robust ionically cross-linked alginate hydrogels. *Biomedical Materials* 6(2) (2011) 025010.
 [2] Pal K., Banthia A.K., Majumdar D.K.: Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications - A mini review. *Designed Monomers and Polymers; Polymeric hydrogels* 12 (2009) 197-220.

References

- [3] Grasselli M., Diaz E.L., Cascone O.: Beaded matrices from cross-linked alginate for affinity and ion exchange chromatography of protein. *Biotechnology Techniques* 7(10) (1993) 707-712.
 [4] Jinchen S., Hauping T.: Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials* 6(4) (2013) 1285-1309.

BADANIA WŁAŚCIWOŚCI TRIBOLOGICZNYCH RESORBOWALNYCH BIOMATERIAŁÓW NA BAZIE POLILAKTYDU

WOJCIECH KARALUS¹, BARBARA SZARANIEC^{2*}, KAROL GRYN², JAN CHŁOPEK², JAN R. DĄBROWSKI¹, MAREK JAŁBRZYKOWSKI¹, EWA SZYMANIUK¹

¹ POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY, KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I BIOMEDYCZNEJ, UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK

² AGH AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

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

Streszczenie

Celem pracy było przeprowadzenie badań tribologicznych i ocena zużycia biokompozytów polimerowych. Do badań przygotowano trzy rodzaje kompozytów z polilaktydu modyfikowanego dodatkami w postaci: włókien węglowych, fosforanu trójwapnia oraz hydroksyapatytu. Ich zachowanie w warunkach tarciovych porównywano z próbkami referencyjnymi (PLA). Badania tribologiczne realizowano w warunkach tarcia suchego oraz w obecności smaru – soli fizjologicznej (roztwór wodny 0,9% NaCl).

Na podstawie badań stwierdzono, że wprowadzenie modyfikatorów ceramicznych do osnowy polilaktydowej poprawiło charakterystyki tribologiczne, zaś dodatek włókien węglowych wpłynął najkorzystniej na obniżenie współczynnika tarcia (μ). Stwierdzono istotny wpływ środka smarnego. O ile w obecności smaru wartości μ dla wszystkich badanych materiałów obniżyły się, to zużycie - wyznaczone na podstawie zmian masy - zmniejszyło się tylko dla czystego polilaktydu oraz polilaktydu modyfikowanego włóknem węglowym. W przypadku kompozytów z fosforanem trójwapniowym i hydroksyapatytem zarejestrowano intensyfikację zużycia.

Uzupełnieniem przeprowadzonych badań były obserwacje powierzchni testowanych próbek przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM). Niezależnie od warunków (ze smarem czy też bez) najmniejszą odpornością na zużycie tarciove cechował się czysty polilaktyd. Kompozyty z dodatkami ceramicznymi wykazywały wyraźne ślady zużycia, zaś obserwacje powierzchni kompozytów wzmacnianych włóknami węglowymi ujawniły, że zewnętrzne warstwy poddawane oddziaływaniu tarcia narażone są na fragmentację włókien węglowych. Zjawisko to może mieć niekorzystny wpływ na możliwość aplikacji takich materiałów w warunkach pracy, w których są narażone na ścieranie.

Słowa kluczowe: trybologia, kompozyty degradable, polilaktyd, hydroksyapatyt, włókna węglowe, fosforan trójwapnia

[Inżynieria Biomateriałów 132 (2015) 24-30]

TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF RESORBABLE POLYLACTIDE-BASED BIOMATERIALS

WOJCIECH KARALUS¹, BARBARA SZARANIEC^{2*}, KAROL GRYN², JAN CHŁOPEK², JAN R. DĄBROWSKI¹, MAREK JAŁBRZYKOWSKI¹, EWA SZYMANIUK¹

¹ BIAŁYSTOK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DEPARTMENT OF MATERIALS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, UL. WIEJSKA 45C, 15-351 BIAŁYSTOK, POLAND

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

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

Abstract

The objective of this study was the observation and evaluation of tribological characteristics and behavior of biocomposites with polymer matrix under different friction conditions. Three types of polylactide composites were considered: with addition of carbon fibers (CF), tricalcium phosphate (TCP) and hydroxyapatite (HAP). As a reference pure polylactide (PLA) samples were prepared. Tribological tests were conducted under dry friction conditions and in the presence of a lubricant – physiological saline (0.9% NaCl aqueous solution).

The results clearly show that introduction of ceramic modifiers to the polylactide matrix enhanced tribological resistance of the composite and carbon fibers addition reduced the value of friction coefficient (μ). It was observed that when the lubricant was present lower values of μ were recorded for all composites but when the wear process was analyzed it was revealed that the loss of mass was reduced only for pure PLA and PLA modified with carbon fibers. For ceramic modified composites the wear processes were more intense.

Scanning electron microscopy was used for surface observations of tested samples. Regardless of friction conditions (with or without lubricant) pure polylactide samples, as the softest, wear the most. When surface of composites with ceramic additives were analyzed the biggest grooves and hollows were observed. Samples with CF exposed to friction conditions reveal inclination to fibers fragmentation, thus application of such composites in kinematic joints in biomedical devices is limited.

Keywords: tribology, degradable composites, polylactide, hydroxyapatite, carbon fibers, tricalcium phosphate

[Engineering of Biomaterials 132 (2015) 24-30]

Wprowadzenie

Polimery w medycynie są stosowane od ponad 50 lat. Początkowo wytwarzano z nich produkty jednorazowego użytku lub nieskomplikowane implanty. Z biegiem lat coraz bardziej doceniano zalety tworzyw polimerowych m.in. takie jak: niska gęstość, niski moduł Younga (nie występuje efekt przeszywnienia), łatwość formowania czy przeświecalność dla promieniowania rentgenowskiego, co wpłynęło na ich znacznie szersze zastosowanie. Obecnie polimery wykorzystywane są w każdej specjalności medycznej m.in. do produkcji implantów zespalających (płytki, śruby, nici), elementów sztucznych narządów, trójwymiarowych podłoży (skafoldów) dla inżynierii tkankowej czy nośników substancji farmakologicznie czynnych [1].

Na szczególną uwagę zasługują termoplastyczne biomateriały polimerowe ulegające biodegradacji takie jak np. polilaktyd i jego kopolimery [2,3]. Stanowią one alternatywę dla biostabilnych polimerów i kompozytów wzmacnianych włóknami sztucznymi [4]. Prostota i efektywność formowania wyrobów z termoplastów, a w przypadku implantów brak konieczności przeprowadzania reoperacji (w celu ich usunięcia) sprawiają, że pojawiają się istotne przesłanki ekonomiczne uzasadniające prowadzone badania w tym obszarze. Badania te koncentrują się na modyfikacji polimerów resorbowlanych, w celu poprawy ich właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych, a tym samym na polepszeniu ich biofunkcyjności [5-7]. Odpowiednio dobrany skład takich kompozytów umożliwia uzyskanie pożądaných właściwości oraz synchronizację czasu resorpcji i regeneracji tkanek [4,8].

Prowadzone są intensywne badania kompozytów na bazie PLA z nanowypełniaczami węglowymi [9,10]. Charakteryzują się one dobrymi właściwościami mechanicznymi i biozgodnością, ale są relatywnie drogie [9]. W nielicznych pracach przedstawia się wyniki badań tribologicznych tego typu biomateriałów [11]. Wydaje się przy tym, że brak wystarczających danych dotyczących charakterystyk tribologicznych znacznie ogranicza ich walory poznawcze i aplikacyjne, zwłaszcza w odniesieniu do procesów degradacji w środowisku tkankowym.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek

Badaniom tribologicznym poddano próbki polilaktydu - PLA (Ingeo 3051D, Nature Works, USA) oraz trzy rodzaje kompozytów na bazie polilaktydu z dodatkami takimi jak: włókno węglowe krótkie - CF (FT 300B, Torayca); hydroksyapatyt - HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (nGimat, USA) oraz fosforan trójwapienia - TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sigma-Aldrich). We wszystkich materiałach kompozytowych wprowadzono 10% mas. dodatku. Wielkość cząstek TCP wynosiła poniżej 20 μm , zaś cząstek HAP poniżej 200 nm. Włókna węglowe miały średnicę ok. 7 μm .

Próbki polimerowe i kompozytowe otrzymywano metodą wtrysku przy użyciu pionowej wtryskarki ślimakowej Multiplas V4-S-15N. Granulat polimerowy wraz z dodatkami suszono przez 6 godzin w temperaturze 50°C. Tak przygotowaną mieszkankę zasypany do wtryskarki, gdzie po podgrzaniu do temp. ok. 160°C homogenizowano ruchem obrotowym ślimaka. Uplastycznioną i zhomogenizowaną masę wytłaczano w postaci filamentu, który następnie cięto. W ten sposób otrzymywano granulaty kompozytowe, które po ponownym zasypaniu do pojemnika wtryskarki uplastyczniano (160-170°C) i wtryskiwano do formy. Na RYS. 1 przedstawiono obrazy mikroskopowe wykonane na skaningowym mikroskopie elektronowym (JEOL JSM 5400) ilustrujące mikrostrukturę otrzymanych kompozytów.

Introduction

Polymers have been used in medicine for over 50 years. Firstly, they were used to manufacture disposable (single-use) products or simple implants. Over the years, the advantages of polymers were appreciated more and more, including e.g.: low density, low Young's modulus (similar to a human bone, thus stress-shielding effect is not observed), high formability, and radiolucency, what resulted in their wider application. Polymers are currently used almost in all fields of medicine e.g.: production of orthopaedic implants (plates, screws, threads), components of artificial organs, three-dimensional scaffolds for tissue engineering, or carriers of pharmacologically active substances [1].

Biodegradable thermoplastic polymer biomaterials, such as polylactide and its copolymers, are particularly deserving an attention [2,3]. They are alternative materials to biostable polymers and composites reinforced with synthetic fibers [4]. The simplicity and effectiveness of forming of thermoplastic products contributes in the variety of use of this type of polymers in medical applications, particularly for implants fabrication. Another advantage of biodegradable implants: no re-operation for implant removal is needed, therefore the total cost of medical treatment is reduced. These studies are focused on modification of resorbable polymers to improve their physiochemical, mechanical, and biological properties (biodegradation, interactions with the organism), and thus, enhancing their biofunctionality [5-7]. An appropriately selected composition of such composites makes it possible to obtain the desired properties and to synchronize the time of resorption with tissue regeneration [4,8].

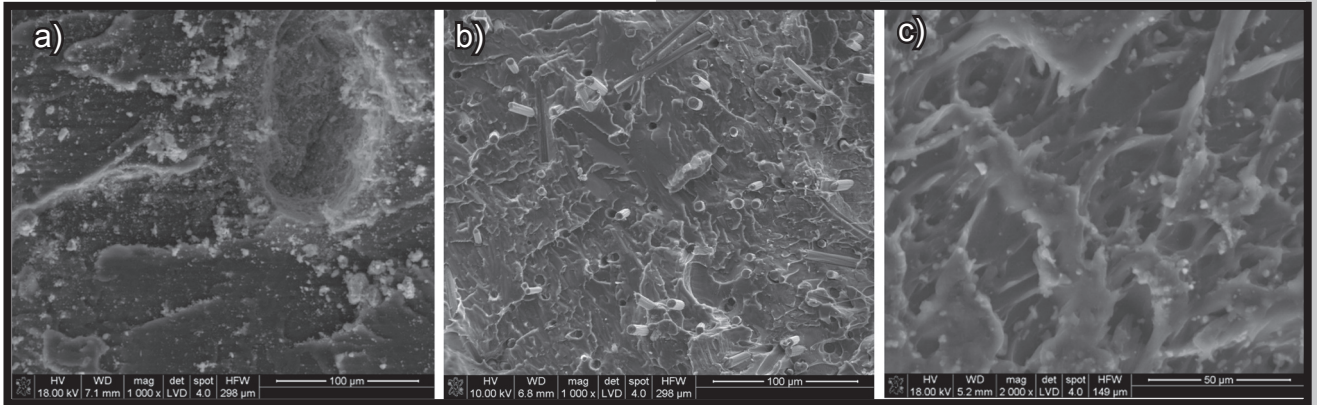
Intensive studies are being conducted on composites based on PLA modified with carbon nanofillers [9,10]. They are characterized by good mechanical properties and biocompatibility but such materials are relatively expensive [9]. The results of tribological tests conducted on this type of biomaterials are presented in a few papers only [11]. It seems that the lack of sufficient data, concerning tribological characteristics, limits both the capability of widening the knowledge about these materials and their potential applications, particularly connected with degradation process in a tissue environment.

Materials and methods

Samples preparation

Poly(lactide (PLA) samples (Ingeo 3051D, Nature Works, USA) and three types of poly(lactide)-based composites with additives such as: short carbon fibers - CF (FT 300B, Torayca); hydroxyapatite - HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (nGimat, USA), and tricalcium phosphate - TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Sigma-Aldrich), were subjected to tests. 10wt% of modifier was added in all cases of composite materials. The size of TCP particles was below 20 μm , and the size of HAP particles was below 200 nm. Carbon fibers had a diameter of approx. 7 μm .

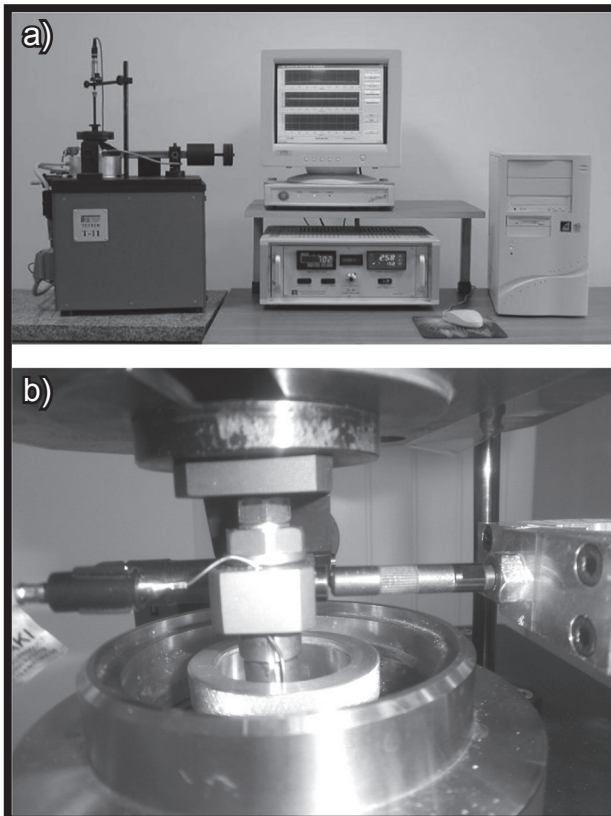
Polymer and composite samples were obtained by the injection method using a screw injection molding machine (Multiplas V4-S-15N). Polymer granulate and additives were dried for 6 h at 50°C and then homogenized in the injection molding machine. Green material was extruded, shredded and grinded. Obtained composite granulates were put in the injection molding machine again, heated up and injected into a mold at 160-170°C. Microstructures of the obtained composites are shown in scanning electron microscope images (JEOL JSM 5400) (FIG. 1).



RYS. 1. Obrazy SEM przełamów kompozytów o osnowie z polilaktydu modyfikowanego: a) hydroksypatytem (HAP), b) włóknem węglowym (CF), c) fosforanem trójwapienia (TCP).
FIG. 1. SEM images of fractures of composites with a polylactide matrix modified with: a) hydroxyapatite (HAP), b) carbon fiber (CF), c) tricalcium phosphate (TCP).

Testy tribologiczne

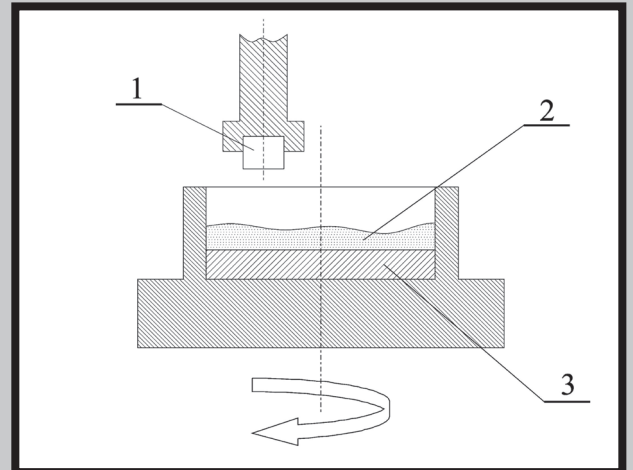
Dla wytworzonych materiałów przeprowadzono badania właściwości tribologicznych. Testy tribologiczne zostały zrealizowane przy użyciu testera trzebień-tarcza (pin-on-disc) - RYS. 2. W skład pary tribologicznej wchodził trzebień wykonany z polilaktydu bądź kompozytu na jego bazie, o średnicy $d = 3$ mm. Przeciwpróbkę stanowiła tarcza z implantacyjnego stopu kobaltowego CoCrMo, o średnicy $d = 25,4$ mm. Schemat węzła tarcia przedstawiono na RYS. 3, zaś dane materiałowe węzła tarcia w testach tribologicznych zamieszczono w TABELI 1.



RYS. 2. Stanowisko badawcze: a) widok ogólny, b) węzeł tarcia.
FIG. 2. A view of laboratory stand: a) general, b) friction node.

Tribological test

For tribological tests a pin-on-disc tester was used (FIG. 2). A schematic diagram of the friction pair is presented in FIG. 3. The tribological pair includes a pin (1) (diameter, $d = 3$ mm) made of polylactide or a polylactide-based composite (TABLE 1) and the disc (3) (diameter, $d = 25.4$ mm) made of a CoCrMo cobalt implant alloy.



RYS. 3. Schemat węzła tarcia: 1 – trzebień, 2 – środek smarny, 3 – tarcza.
FIG. 3. Schematic diagram of friction pair: 1 – pin, 2 – lubricant, 3 – disc.

TABELA 1. Materiały tarcia wykorzystane w badaniach tribologicznych.

TABLE 1. Friction materials used for tribological tests.

Węzeł tarcia Friction pair	Materiały Materials
trzebień pin	A - PLA B - PLA + CF C - PLA + HAP D - PLA + TCP
środek smarny lubricant	roztwór fizjologiczny 0,9% NaCl 0.9 % NaCl physiological saline
tarcza disc	stop kobaltowy CoCrMo, chropowatość powierzchni $R_a = 0,4 \mu\text{m}$ CoCrMo alloy, surface roughness $R_a = 0.4 \mu\text{m}$

Na podstawie badań wstępnych oraz analizy danych literaturowych przyjęto następujące parametry badań tribologicznych: prędkość tarcia $v = 0,1$ m/s, promień tarcia $r = 8$ mm, prędkość obrotowa przeciwróbki $n = 120$ obr/min; naciski jednostkowe $p = 1,0; 5,5; 10$ MPa, czas tarcia: $\tau = 10; 35; 60$ min, objętość środka smarnego $V = 4$ cm³. Badania zostały oparte o plan kompletny 3², każdy parametr został powtórzony trzykrotnie. Testy tribologiczne realizowano w warunkach tarcia suchego i w obecności smaru – roztworu fizjologicznego (0,9% NaCl).

Wyniki badań tribologicznych poddano obróbce statystycznej za pomocą pakietu STATISTICA. Za pomocą mikroskopu optycznego OLYMPUS BX – 51 oceniono topografię powierzchni próbek.

Wyniki i dyskusja

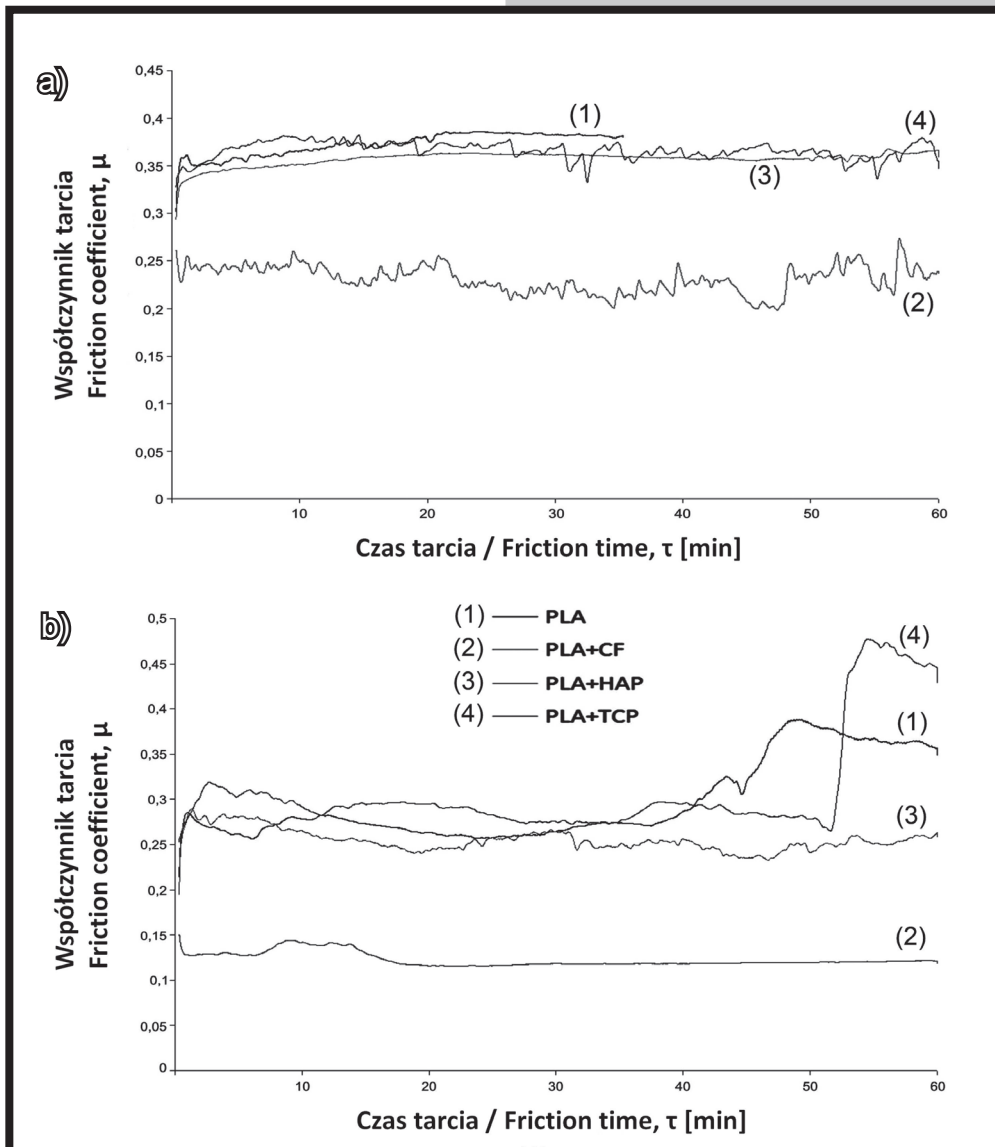
Przykładowe zależności zmiany współczynnika tarcia w funkcji czasu, przy naciskach rzędu 10 MPa, przedstawione zostały na RYS. 4.

Based on preliminary research and analysis of data from the literature, the following parameters of tribological tests were accepted: friction velocity $v = 0.1$ m/s; friction radius $r = 8$ mm; countersample (disc) rotational velocity $n = 120$ rev/min; unit pressures $p = 1.0; 5.5; 10$ MPa, time of friction in a single test: $\tau = 10; 35; 60$ min; lubricant volume $V = 4$ cm³. The tests according to the complete plan 3² were performed, and each combination of parameters was repeated three times. Tribological tests were conducted under conditions of dry friction and in the presence of lubricant - physiological saline (0.9% NaCl).

The results of tribological tests were subjected to statistical processing using STATISTICA software. The surface topography of samples was assessed using an OLYMPUS BX - 51 optical microscope.

Results and Discussion

Selected results of the conducted research are shown below. Examples of friction coefficient changes as a function of time for $p = 10$ MPa are presented in diagrams (FIG. 4).

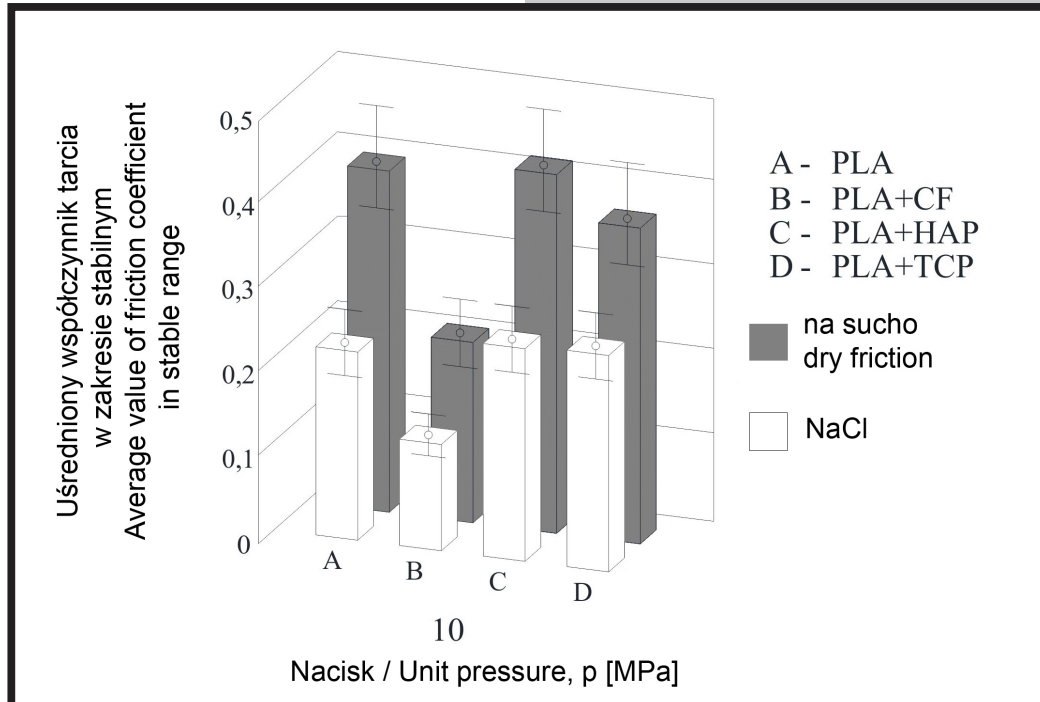


RYS. 4. Zmiany współczynnika tarcia w funkcji czasu dla różnych kompozytów ($p = 10$ MPa): a) tarcie suche, b) w środowisku NaCl.

FIG. 4. Friction coefficient change as a function of time for different composites ($p = 10$ MPa): a) dry friction, b) NaCl environment.

Zamieszczone wyniki świadczą o znaczącym zróżnicowaniu właściwości tarciovych badanych materiałów. Najmniejszymi oporami ruchu charakteryzował się kompozyt z napelniaczem węglowym. Widoczny jest też korzystny wpływ środowiska smarnego na przebieg tarcia badanych materiałów. Opory ruchu dla wszystkich materiałów uległy obniżeniu w obecności roztworu NaCl. Podobne tendencje zmian współczynnika tarcia były obserwowane również w testach przy innych (mniejszych) obciążeniach. Egzemplifikacją tych tendencji są wyniki uśrednionych wartości współczynników tarcia, obliczonych dla obszarów tarcia ustabilizowanego, przedstawione na RYS. 5.

The presented results indicate variation of the friction properties of the studied materials. The composite with carbon filler was characterized by the least resistance to a motion. There was observed a favorable influence of the lubricant environment on the course of friction of the studied materials. The resistances to a motion of all materials were reduced in the presence of the NaCl solution. Similar tendencies of friction coefficient changes were also observed in tests with different (lower) pressures. The results of averaged friction coefficient values, calculated for stabilized friction areas and presented in FIG. 5, exemplify these tendencies.



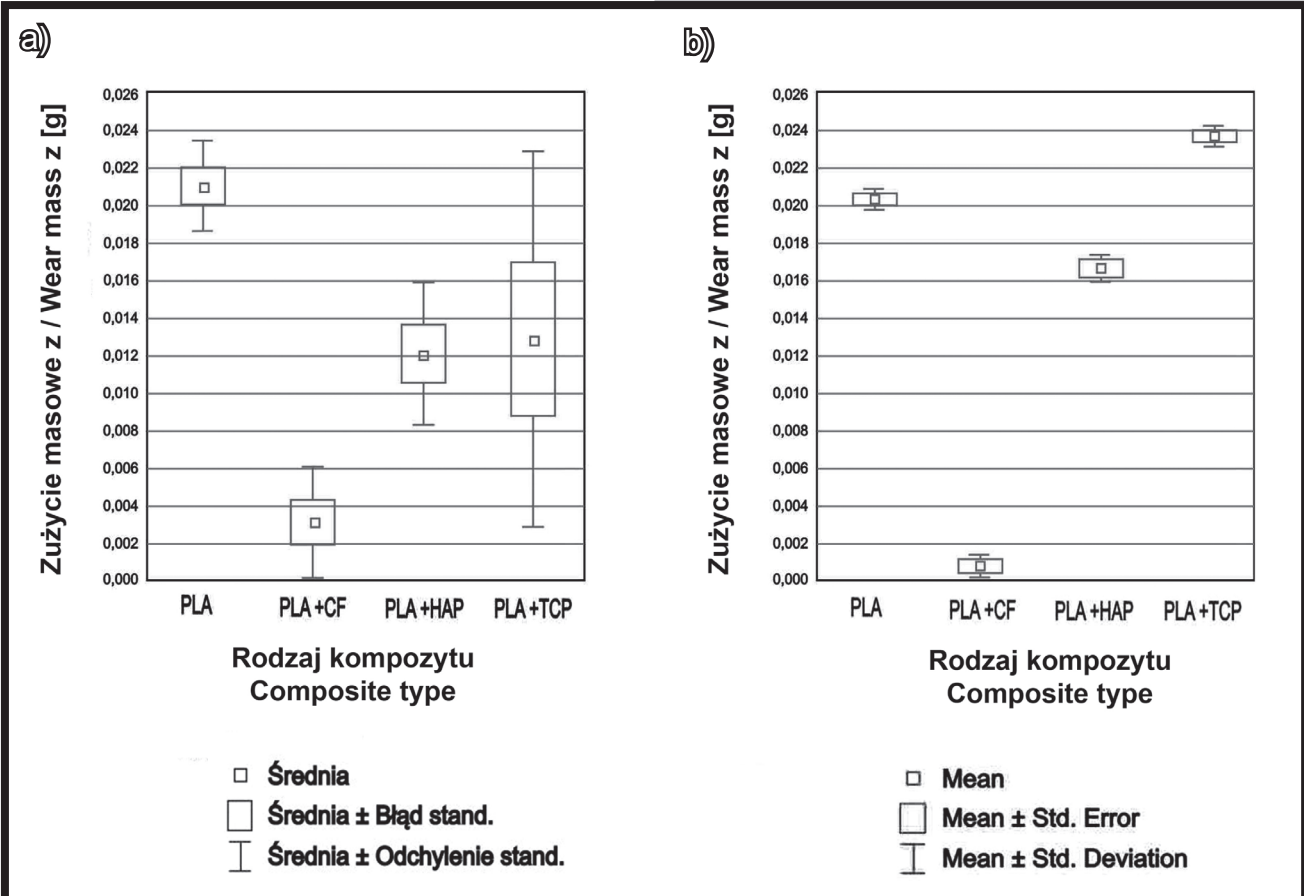
RYS. 5. Średnie wartości współczynników tarcia badanych materiałów ($p = 10$ MPa).
FIG. 5. Average values of the friction coefficients of the tested materials ($p = 10$ MPa).

Po testach tarciovych oceniano zużycie masowe próbek (trzpieni) badanych materiałów. Przykładowe wyniki tych badań zostały zamieszczone na RYS. 6. Podobnie jak w przypadku badań tarcia, również zużycie materiałów było zróżnicowane i zależne od warunków tarcia. Podobnie jak w wyżej omawianych przypadkach, najmniejsze zużycie obserwowano dla kompozytów z napelniaczem węglowym. Znamienny jest przy tym wpływ środowiska smarnego na procesy zużyciowe: obecność smaru powodowała wzrost zużycia kompozytów z hydroksyapatytem i fosforanem trójwapnia. Jest to spowodowane negatywnym wpływem środowiska wodnego na stabilność takich materiałów w wyniku procesów rozpuszczania i/lub uwalniania fazy nieorganicznej.

Cennym uzupełnieniem testów tribologicznych są wyniki obserwacji powierzchni tarcia badanych materiałów. Należy podkreślić generalnie niską odporność polilaktidu na zużycie tribologiczne. W tym kontekście wpływ dodatku węglowego na znaczące obniżenie zużycia takich materiałów jest bardzo korzystnym efektem. Równocześnie jednak, dla tego kompozytu zaobserwowano wyraźne procesy destrukcji powierzchni tarcia, co zilustrowano na RYS. 7. Wydaje się, że obecność włókien węglowych korzystnie wpływa na opory ruchu i obniżenie zużycia. Jednakże niska stabilność takich kompozytów może ograniczać możliwości ich aplikacji w warunkach tarcia.

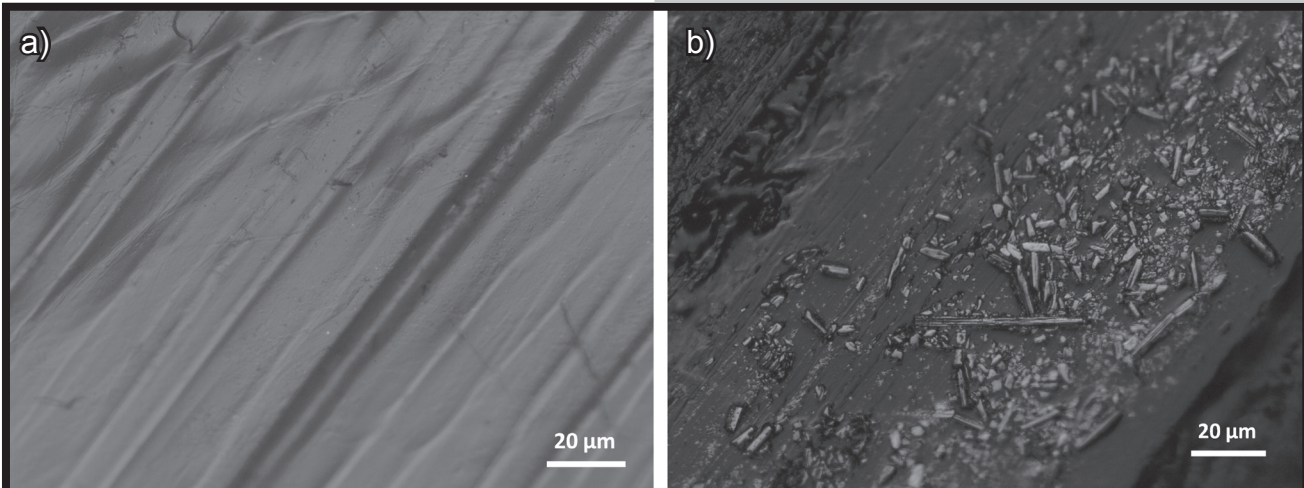
After friction tests were finished, the wear of samples (pins) of the studied materials was evaluated. The results of these tests are shown in FIG. 6. It was observed that the wear of materials varied, similarly to the friction tests, and it was correlated with friction condition. The lowest wear values were observed for the composites with carbon filler (sample C). A big impact of the lubricant environment on wear processes was observed. A wear of composites with hydroxyapatite and tricalcium phosphate (samples C and D) was much higher in the presence of lubricant than in dry friction conditions. This is the result of the negative influence of an aqueous environment on the stability of such materials, due to processes of dissolution and/or release of the inorganic phase.

Poly lactide, as a material, has rather low tribological resistance. Introduction of carbon additives into the polylactide matrix increases this parameter (has a favorable impact on resistance to a motion and wear reduction). However, analysis of the friction surfaces of studied materials revealed clear processes of destruction of the friction surface, as illustrated in FIG. 7. Thus, the poor stability of such composites may limit their possible application.



RYS. 6. Zużycie masowe badanych materiałów: a) tarcie suche, b) w środowisku NaCl ($p = 10$ MPa, czas tarcia $\tau = 60$ min).

FIG. 6. Wear of the studied materials: a) dry friction, b) with NaCl solution ($p = 10$ MPa, friction time $\tau = 60$ min).



RYS. 7. Ślad tarcia na próbce (trzcpien): a) czysty PLA, b) PLA + CF.

FIG. 7. Traces of friction on the sample (pin); a) pure PLA, b) PLA + CF.

Należy podkreślić generalnie bardzo niską odporność polilaktidu na zużycie tribologiczne. Wyniki badań wskazują na znaczący wpływ napełniaczy na właściwości tribologiczne badanych kompozytów. Najlepszymi charakterystykami tribologicznymi charakteryzował się kompozyt z napełniaczem węglowym. Najniższe zużycie masowe próbek obserwowano podczas tarcia suchego, jak również w obecności smaru – roztworu wodnego soli kuchennej. Znaczący wzrost zużycia zaobserwowano w przypadku próbek z napełniaczami fosforanowymi (TCP, HAP) w obecności smaru. Może to być spowodowane rozpuszczalnością napełniaczy, co tym samym może intensyfikować procesy zużycia warstw wierzchnich badanych kompozytów. Wyraźnie widoczna jest też większa stabilność procesów tarcia i zużycia w warunkach smarowania. Obserwacje mikroskopowe śladów tarcia wskazują na podatność takich materiałów na niszczenie warstw wierzchnich podczas tarcia. Fragmentacja twardych włókien węglowych w kompozytach z napełniaczem CF (RYS. 7b) może prowadzić do niekorzystnych zjawisk zużycia wtórnego. Może to mieć negatywny wpływ w przypadku aplikacji tego typu materiałów, zwłaszcza w połączeniach kinematycznych konstrukcji biomedycznych.

Podziękowania

Praca została przygotowana przy wsparciu w ramach grantu NCBiR N R15 0117 10.

Conclusions

The generally very low resistance of polylactide to tribological wear should be emphasized. Test results indicate a significant impact of fillers on the tribological properties of the studied composites. The composite with carbon filler was characterized by the best tribological characteristics. The lowest wear of sample B (PLA+CF) has been observed during dry friction conditions as well as in the presence of the lubricant. A significant increase of wear of samples with phosphorus fillers (TCP, HAP) has been noticed in the presence of the lubricant. It may be caused by the solubility of fillers and also it can intensify wear processes of examined composites at the same time. A greater stability of the friction processes as well as the wear in the presence of lubrication is clearly visible. However, microscopic observations of friction traces indicate the susceptibility of such materials to the destruction of surface layers during friction. The fragmentation of hard carbon fibres in the composites with CF fillers (FIG. 7b) may lead to disadvantageous phenomenon of secondary wear. This may have an unfavorable impact on the possibilities of application of these materials, particularly in the kinematic joints in biomedical devices.

Acknowledgements

This paper has been prepared with support within the framework of grant NCBiR N R15 0117 10.

Pismienictwo

- [1] Błażewicz S., Stoch L., Biomateriały. Tom 4. Warszawa Akademyka Oficyna Wydawnicza EXIT 2003.
- [2] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Szaraniec B.: The influence of the environment on the degradation of polylactides and their composites. *J. Achiev. Mat. Manuf. Eng.* 43(1) (2010) 72-79.
- [3] Middleton C.J., Tipton A.J.: Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21 (2000) 2335-2346.
- [4] Nair L.S., Laurencin C.T.: Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762-794.
- [5] Bourmaud A., Pimbert S.: Investigations on mechanical properties of poly(-propylene) and poly(lactic acid) reinforced by miscanthus fibers. *Composites Part A*, 39 (2008) 1444-1454.
- [6] Hongyan Han, Xiaodong Wang, Dezhen Wu: Preparation, crystallization behaviors, and mechanical properties of biodegradable composites based on poly(L-lactic acid) and recycled carbon fiber. *Composites. Part A*, 43 (2012) 1947-1958.
- [7] Szaraniec B.: Durability of Biodegradable Internal Fixation Plates. *Materials Science Forum* 730 (2012) 15-19.

References

- [8] Rahul M., Rasala B., Amol V., Janorkar C., Douglas E., Hirt L.: Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 338-356.
- [9] Karbushev V.V., Konstantinov I.I., Parsamyan I.L., Kulichikhin V.G., Popov V.A., George T.F.: Preparation of polymer-nanodiamond composites with improved properties. *Adv Mater. Res.* 59 (2008) 5-12.
- [10] Mochalin V.N., Shenderova O., Ho D., Gogotsi Y.: The properties and applications of nanodiamonds. *Nat. Nano* 7 (2012) 11-23.
- [11] Orozco V., Brostow W., Chonkaew W., Lopez B.: Preparation and Characterization of Poly(Lactic Acid)-g-Maleic Anhydride Starch Blends. *Macromolecular Symp.* 277 (2009) 69-80.
- [12] Kennedy F.E., Lu Y., Bakier I.: Contact temperatures and their influence on wear during pin-on-disk tribotesting. *Tribology International* 82 (2015) 534-542.
- [13] Andrysewicz E., Mystkowska J., Dąbrowski J.R., Olchowik R.: Influence of self-made saliva substitutes on tribological characteristics of human enamel. *Acta Bioeng Biomech.* 16(2) (2014) 67-74.



STUDIA PODYPLOMOWE

Biomateriały – Materiały dla Medycyny

2015/2016

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

