

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

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

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

Number 134

Numer 134

Volume XIX

Rok XIX

JANUARY 2016

STYCZEŃ 2016

ISSN 1429-7248

PUBLISHER:

WYDAWCA:

**Polish Society
for Biomaterials
in Krakow**

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

**EDITORIAL
COMMITTEE:**

KOMITET

REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief

Redaktor naczelny
Jan Chłopek

Editor

Redaktor

Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial

Sekretarz redakcji

Design

Projekt

Katarzyna Trała

Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF

EDITORIAL OFFICE:

ADRES REDAKCJI:

AGH-UST

30/A3, Mickiewicz Av.

30-059 Krakow, Poland

Akademia

Górnictwo-Hutnicza

al. Mickiewicza 30/A-3

30-059 Kraków

Issue: 250 copies

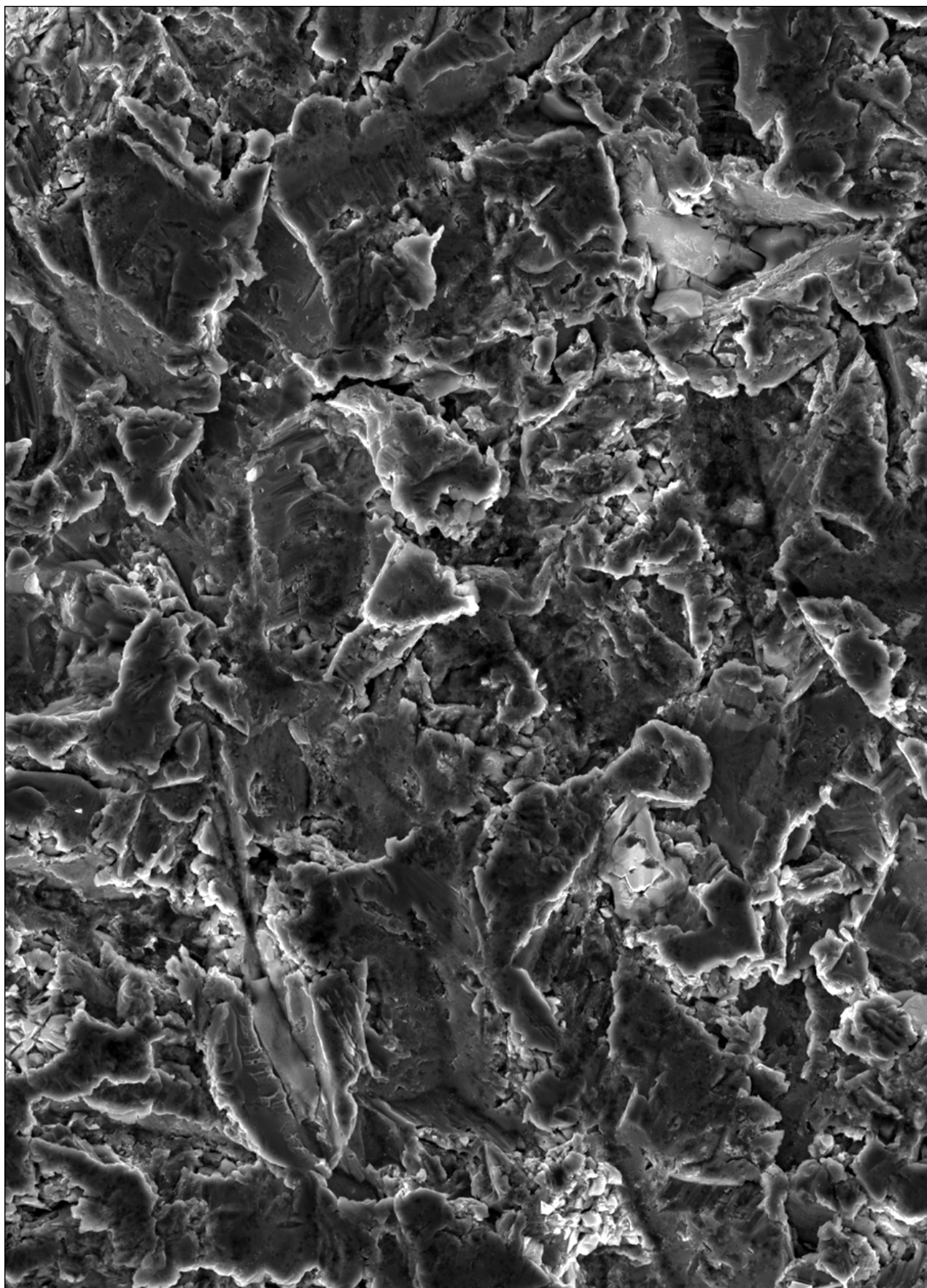
Nakład: 250 egz.

**Scientific Publishing
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe

AKAPIT

e-mail: wn@akapit.krakow.pl



EDITORIAL BOARD KOMITET REDAKCYJNY

EDITOR-IN-CHIEF

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

EDITOR

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

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

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

Romuald Będziński - WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

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

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

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

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Eppe - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

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

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

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

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

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

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

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

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

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

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

Warunki prenumeraty

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

Instructions for authors

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

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

Subscription terms

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



25th Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine

Anniversary Conference

13 – 16 October 2016 Rytró, Poland

WE HAVE A LOT TO CELEBRATE!

25th

**ANNIVERSARY
CONFERENCE**

20

**YEARS OF THE
POLISH SOCIETY
FOR BIOMATERIALS**

**SUBMIT YOUR
ABSTRACT AND FULL PAPER
WWW.BIOMAT.AGH.EDU.PL**



SPIS TREŚCI

THE EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE ADDITION ON PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF $\text{Na}_2\text{O-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ AND $\text{CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ GLASSES OLIWIA KALWASIŃSKA, MARCIN GAJC, ANDRZEJ KŁOS, KRZYSZTOF ORLIŃSKI, DOROTA A. PAWLAK, MAŁGORZATA KROK-BORKOWICZ, ŁUCJA RUMIAN, KRZYSZTOF PIETRYGA, KATARZYNA RECZYŃSKA, ELŻBIETA PAMUŁA	2
OCENA STOPNIA PROLIFERACJI KOMÓREK OSTEOSTOPODOBNYCH W KONTAKCIE Z POWIERZCHNIAMI STOPU TYTANU PO PIASKOWANIU DO RÓŻNEGO STOPNIA CHROPOWATOŚCI DOROTA BOCIĄGA, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA	8
BADANIE PROCESU RELAKSACJI NAPRĘŻEŃ SKÓRY ŚWIŃSKIEJ ANETA LIBER-KNEĆ, SYLWIA ŁAGAN	18
BADANIA <i>IN VITRO</i> AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH Mg, Sr i Au WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL LIDIA CIOŁEK, ANDRZEJ OLSZYNA, EWA ZACZYŃSKA, ANNA CZARNY, MONIKA BIERNAT	25

CONTENTS

THE EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE ADDITION ON PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF $\text{Na}_2\text{O-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ AND $\text{CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ GLASSES OLIWIA KALWASIŃSKA, MARCIN GAJC, ANDRZEJ KŁOS, KRZYSZTOF ORLIŃSKI, DOROTA A. PAWLAK, MAŁGORZATA KROK-BORKOWICZ, ŁUCJA RUMIAN, KRZYSZTOF PIETRYGA, KATARZYNA RECZYŃSKA, ELŻBIETA PAMUŁA	2
EVALUATION OF PROLIFERATION RATE OF OSTEOLAST-LIKE CELLS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY SURFACES SANDBLASTED TO DIFFERENT ROUGHNESS LEVEL DOROTA BOCIĄGA, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA	8
TESTING STRESS RELAXATION PROCESS OF A PORCINE SKIN ANETA LIBER-KNEĆ, SYLWIA ŁAGAN	18
IN VITRO STUDIES OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOL-GEL BIOGLASSES CONTAINING Mg, Sr AND Au LIDIA CIOŁEK, ANDRZEJ OLSZYNA, EWA ZACZYŃSKA, ANNA CZARNY, MONIKA BIERNAT	25

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

THE EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE ADDITION ON PHYSICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF $\text{Na}_2\text{O-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ AND $\text{CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ GLASSES

OLIWIA KALWASIŃSKA¹, MARCIN GAJC², ANDRZEJ KŁOS²,
KRZYSZTOF ORLIŃSKI², DOROTA A. PAWLAK^{2,3},
MAŁGORZATA KROK-BORKOWICZ⁴, ŁUCJA RUMIAN⁴,
KRZYSZTOF PIETRZYGA⁴, KATARZYNA RECZYŃSKA⁴,
ELŻBIETA PAMUŁA^{4*}

¹ WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW, POLAND

² INSTITUTE OF ELECTRONIC MATERIALS TECHNOLOGY,
WÓLCZYŃSKA 133, 01-919 WARSAW, POLAND

³ CENTRE OF NEW TECHNOLOGIES,
BANACHA 2C, 02-097 WARSAW, POLAND

⁴ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

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

Abstract

Two types of phosphate glasses $50\text{Na}_2\text{O-}20\text{B}_2\text{O}_3\text{-}30\text{P}_2\text{O}_5$ (NBP) and $30\text{CaO-}20\text{Na}_2\text{O-}50\text{P}_2\text{O}_5$ (CNP) with different content of TiO_2 (0, 3 and 5 mol%) have been prepared by melt-quenching process. TiO_2 was added to increase glass network stability. Physical properties of glasses were investigated by density measurements, differential scanning calorimetry and degradation in phosphate buffered saline (PBS). Biological performance of glasses in a direct contact with osteoblast-like MG-63 cells was analysed with the use of resazurin test and live-dead staining. The results show that TiO_2 addition increased density, glass transition temperature (T_g) and melting temperature (T_m) of both types of glasses. In the case of NBP glasses presence of TiO_2 resulted in their fast degradation in PBS and acidification of cell culture medium. As a consequence such glasses did not support cell adhesion and growth, but they can be considered for e.g. drug delivery systems. On the other hand addition of TiO_2 to CNP glasses resulted in enhanced cell adhesion and viability. Particularly positive results were found for CNP glass containing 5% TiO_2 , so it can be a good candidate as a scaffold material for bone tissue engineering.

Keywords: phosphate glasses, bioactive glasses, titanium dioxide, tissue engineering

[Engineering of Biomaterials 134 (2016) 2-7]

Introduction

Treatment of bone defects caused by trauma or diseases is performed with the use of auto-, allo- and xenogeneic grafts, although their shortcomings are risk of disease transmission, limited amount, unpredictable resorption kinetics, etc. [1,2]. Therefore in the last two decades new biomaterials for replacement and regeneration of bone tissue defects have been intensively studied [3]. Particularly prospective alternatives are porous scaffolds, whose role is not only to support, but also to stimulate bone tissue ingrowth and remodelling. Fabrication methods of scaffolds include microsphere sintering, foam replication, electrospinning and rapid prototyping techniques [4]. Requirements for scaffolds and biomaterials from which they are made include:

- biocompatibility, no cytotoxic action,
- easy adhesion, proliferation and differentiation of cells on their surface,
- adequate degradation rate correlated with the tissue growth,
- bioactivity, i.e. the ability of formation of a direct bond between scaffold surface and bone tissue through low-crystalline hydroxyapatite layer,
- mechanical properties comparable to those of the replaced tissue,
- porous structure to facilitate tissue ingrowth,
- easy fabrication,
- susceptibility to sterilization [3,4,5].

Popular biomaterials for bone tissue engineering are bioactive glasses based on silica, especially 45S5 glass available under a trade name Bioglass®. However, despite its clinical application, for example for orthopaedic bone grafting (NovaBone) [6] these glasses have also some drawbacks, e.g.:

- prolonged biodegradation, which is difficult to control and causes problems with matching the degradation rate of the glass and the growth rate of new tissue,
- incomplete transition of glass into hydroxyapatite and presence of SiO_2 that may cause long-term side effects,
- difficult sintering process due to the viscous flow of the glass above its glass transition temperature (T_g) and the tendency to crystallize because of narrow window between T_g and crystallization temperature (T_c), which affects strength of the produced scaffold,
- high sintering temperature – addition of Na_2O and CaO decreases temperature, but it may simultaneously cause decrease in bioactivity, as a consequence of glass crystallization [3,7,8,9].

According to the above-mentioned drawbacks of the silica glasses, there is a rationale for the development of new bioactive glasses for tissue engineering. In comparison to the silica-based glasses, phosphate glasses have lower melting temperature, what makes fabrication of scaffolds easier. Moreover their biodegradation rate can be easily controlled by modifying the composition of glass, for example by the addition of TiO_2 , and finally P_2O_5 is a component of hydroxyapatite, an integral part of bone extracellular matrix [8,10].

In this study we obtained and investigated phosphate glasses from two systems: $\text{Na}_2\text{O-B}_2\text{O}_3\text{-P}_2\text{O}_5$ (NBP) and $\text{CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (CNP) as pure and modified with TiO_2 . TiO_2 is known as a network modifier, which allows to control solubility of glasses and can improve cellular response [11]. Pure CNP glass and those glasses modified with TiO_2 were investigated in other studies [12]. According to our knowledge NBP glasses have not been examined so far as materials for bone tissue engineering.

Experimental

Glass synthesis

For glass fabrication we used conventional melt quenching process. NBP type glasses were prepared from Na_2CO_3 (99.99%), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pure) and H_3BO_3 (99.99%) in a 2.5:3:2 molar ratio as described before [13]. The synthesis of NBP glasses was carried out in the alumina mortar at 920°C. CNP type glasses were prepared from Na_2CO_3 , CaCO_3 and P_2O_5 powders. The synthesis was two-step process including melting in the alumina mortar at 1075°C and then melting in the platinum crucible at 1050°C. The composition of obtained glasses is summarized in TABLE 1. FIG. 1 shows gross morphology of obtained glasses.

Density

We used pycnometer method to determine density of glasses. First, mass of the glass sample was measured, then mass of the pycnometer with water and mass of the pycnometer with water and sample were measured. Measurements were repeated three times for each sample. The density was calculated from the formula:

$$d_s = \frac{m_s \cdot d_w}{m_w + m_s - m_{ws}}$$

where:

d_s – density of the sample,

m_s – mass of the sample,

m_w – mass of the pycnometer with water,

m_{ws} – mass of the pycnometer with water and sample,

d_w – density of water.

Results are shown as average $\pm$ standard deviation.

Differential scanning calorimetry

Differential scanning calorimetry measurements were carried out on simultaneous thermal analyser (Netzsch STA 449F1Jupiter®). We used powder samples of about 30 mg. Heating rate was 10°C/min. Measurements were carried out in argon atmosphere. Glass transition temperature (T_g) was determined as characteristic inflection point on heating curve. Exothermic peak on heating curve was interpreted as crystallization of material; endothermic peak was connected with melting of material. Temperatures corresponding to the onsets of crystallization process and melting process were determined as crystallization temperature (T_c) and melting temperature (T_m), respectively.

Degradation

Degradation of glass samples was investigated in phosphate-buffered saline (PBS, Life Technologies). The composition of PBS was KH_2PO_4 (144 mg/L), NaCl (9000 mg/L), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (795 mg/L); pH was 7.4. We prepared set of three samples of each type of glass for several time points: 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 3 days and 7 days for pure glasses and 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 3 days and 7 days for glasses modified with TiO_2 . Masses of the samples were in the range of 30–50 mg. Each sample was placed in sterile polystyrene container with 10 mL of PBS. Degradation test was carried out at 37°C and pH of PBS was measured. At each time point samples were collected, dried and then weight of the samples after drying to a constant weight was measured.

Biological evaluation

Before *in vitro* tests glass plates (1 cm x 1 cm) were sterilised by immersion in 70% ethanol for 5 min followed by UV exposition for 20 min for both sites and placed in 12-well cell culture plates (EuroClone). MG-63 osteoblast-like cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) suspended in minimal essential medium (MEM, PANTM BIOTECH, Germany) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 2 mM/L-glutamine (PAA, Austria) were seeded on each sample at initial density of 1×10^4 cells/ml at 37°C under 5.0% CO_2 atmosphere and cultured for 24 h, 3 days and 7 days. Tissue culture polystyrene (TCPS, i.e. bottom of the well plates) was used as control. Cell viability was evaluated using In Vitro Toxicology Assay Kit, based on resazurin (Sigma Aldrich). 0.1 ml of resazurin reagent was added to each well and the cells were incubated for 4 h at 37°C. Reduction of resazurin was measured fluorescently (excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 590 nm) (FLUOstar Omega, BMG labtech, Germany) and calculated according to the formula:

$$\% \text{ Reduction of resazurine} = \frac{S^* - S^{\text{control}}}{S^{100\% \text{ reduced}} - S^{\text{control}}} \cdot 100\%$$

where:

S^* – fluorescence of samples

S^{control} – fluorescence of medium without cells

$S^{100\% \text{ reduced}}$ – fluorescence of reagent reduced in 100% (reagent with medium was placed in autoclave for 15 min at 121°C).

Results were expressed as average $\pm$ standard deviation (SD) from three independent samples performed in triplicate. Statistical significance was evaluated according to the unpaired t-test; $p < 0.05$ was considered significant.

TABLE 1. Composition of obtained glasses.

Type of glass	P_2O_5 % mol	Na_2O % mol	B_2O_3 % mol	CaO % mol	TiO_2 % mol
NBP	30	50	20	-	0
CNP	50	20	-	30	0
NBP: 3% TiO_2	30	47	20	-	3
NBP: 5% TiO_2	30	45	20	-	5
CNP: 3% TiO_2	50	17	-	30	3
CNP: 5% TiO_2	50	15	-	30	5

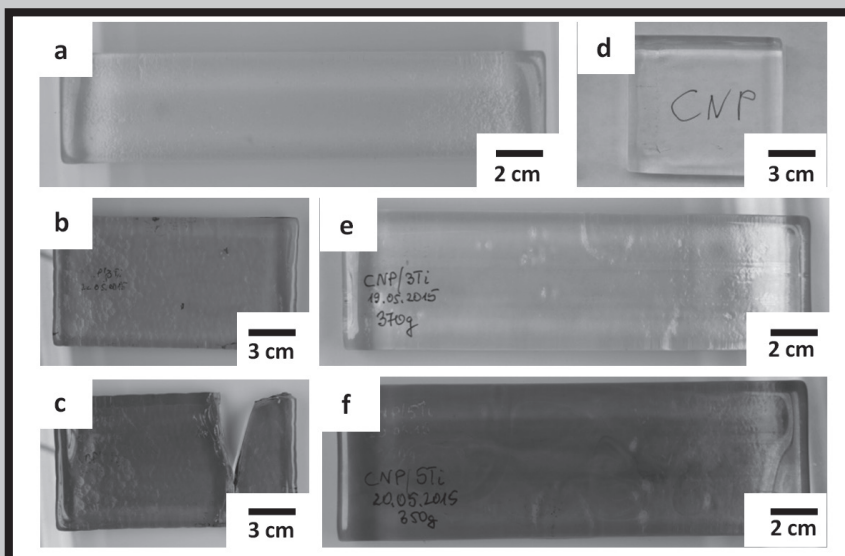


FIG. 1. Gross morphology of glass samples: a) NBP; b) NBP 3% mol TiO_2 ; c) NBP 5% mol; d) CNP; e) CNP 3% mol TiO_2 ; f) CNP 5% mol TiO_2 .

To visualize cell attachment and distribution on the samples, the cell cultures were observed using fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert, Germany). A *live-dead* staining was performed to evaluate cell viability. Samples were rinsed with PBS (PANTM BIOTECH, Germany) and the supernatant was replaced by 1 ml PBS solution containing 2 μ l (1 mg/ml) calcein AM and 2 μ l (1 mg/ml) propidium iodide (Sigma-Aldrich).

Results and discussion

Density

TABLE 2 shows results of density measurements. Density of pure NBP glass is slightly lower than density of pure CNP glass. TiO₂ addition increases density of both types of glass. For NBP glasses densities vary from 2.548 $\pm$ 0.016 g/cm³ for pure NBP glass to 2.601 $\pm$ 0.017 g/cm³ for NBP glass with 5 mol% TiO₂. Addition of 5 mol% TiO₂ in the case of CNP glasses changes density from 2.588 $\pm$ 0.004 g/cm³ for pure CNP glass to 2.621 $\pm$ 0.007 g/cm³. It has been reported that TiO₂ addition changes the structure of sodium borophosphate and soda-lime phosphate glasses by formation of P-O-Ti bond instead of P-O-P and P-O-B bonds [12,14,15]. Presence of titanium ions leads to increase in network cross-links and results in denser packing of the structure, hence we observed increase in density for glasses containing TiO₂ [14].

TABLE 2. Density of glasses.

Type of glass	Density [g/cm ³]	Type of glass	Density [g/cm ³]
NBP	2.548 $\pm$ 0.016	CNP	2.588 $\pm$ 0.004
NBP 3 mol% TiO ₂	2.586 $\pm$ 0.010	CNP 3 mol% TiO ₂	2.595 $\pm$ 0.004
NBP 5 mol% TiO ₂	2.601 $\pm$ 0.017	CNP 5 mol% TiO ₂	2.621 $\pm$ 0.007

Differential scanning calorimetry

TABLE 3 shows characteristic temperatures of glasses. Glass transition temperature (T_g) of NBP is 432.5°C and increases to 436.9°C for NBP glass containing 3 mol% TiO₂ and to 447.7°C in the case of 5 mol% TiO₂ addition. Similarly, TiO₂ addition causes increase in melting temperature (T_m). In contrast, addition of 3 mol% TiO₂ decreases crystallization temperature (T_c) from 596.7°C to 579.0°C, but addition of 5 mol% TiO₂ slightly increases T_c to 603.2°C. In comparison to NBP glass, CNP glass has slightly lower glass transition temperature of 412.3°C. TiO₂ addition to CNP glasses causes increase of T_g from 412.3°C to 437.4°C, and T_c from 536.7°C to 602.4°C and T_m from 682.5°C to 749.0°C. Increase in thermal stability as well as increase in densities for TiO₂ containing glasses is a result of modification of glass network by TiO₂ which is due to depolymerisation of borate and phosphate chains and formation of P-O-Ti bonds [14,16]. FIG. 2 shows DSC curves for NBP type and CNP type glasses. Presence of multiple endothermic and exothermic peaks is connected with transformations of different glass phases. For unmodified CNP glass we observe two crystallization peaks and three melting peaks. Two crystallization peaks and two melting peaks appear for CNP glass containing 3 mol% TiO₂. For CNP glass with 5 mol% TiO₂ we observe two crystallization peaks and one melting peak.

TABLE 3. Characteristic temperatures of glasses.

Type of glass	Glass transition temperature T_g [°C]	Crystallization onset temperature T_c [°C]	Melting onset temperature T_m [°C]
NBP	432.5	596.7	743.9
NBP 3 mol% TiO ₂	436.9	579.0	759.2
NBP 5 mol% TiO ₂	447.7	603.2	760.9
CNP	412.3	536.7	682.5
CNP 3 mol% TiO ₂	420.5	581.2	738.7
CNP 5 mol% TiO ₂	437.4	602.4	749.0

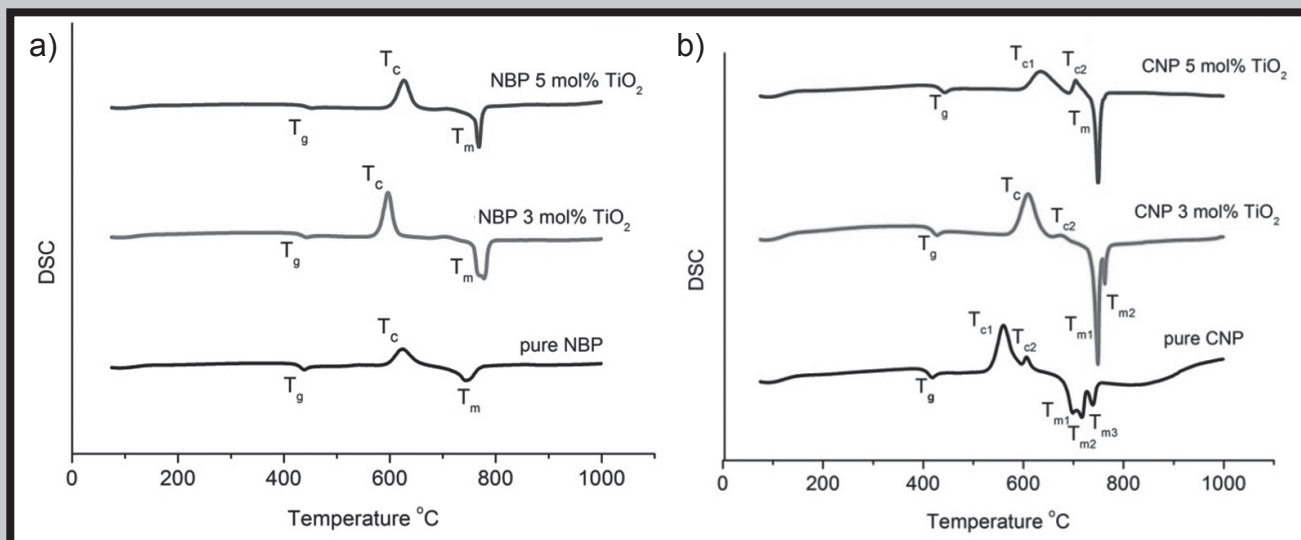


FIG. 2. DCS curves of: a) NBP type glasses; b) CNP type glasses.

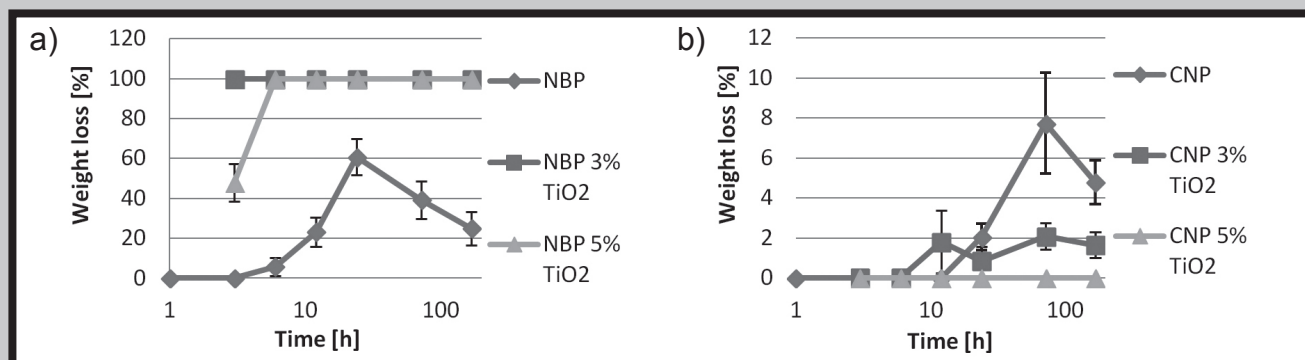


FIG. 3. Weight loss of glass samples as a function of time: a) NBP type glasses; b) CNP type glasses.

Degradation

FIG. 3 shows weight loss results of NBP (FIG. 3a) and CNP (FIG. 3b) type glasses as a function of incubation in PBS. Weight loss of NBP glass after 24 h is about $61 \pm 9\%$, but it decreases within the following days. Interestingly, after longer incubation time in PBS weight loss of NBP glass decreases. It can be connected with precipitation of new mineral phase on the glass surface [18]. Addition of TiO₂ as a network modifier does not improve stability of NBP glass (FIG. 3a). On the contrary, it results in very rapid glass dissolution: NBP 3% TiO₂ dissolves faster than that containing 5% TiO₂. CNP glass is much more stable: it starts to dissolve after 10 h and after 3 days its weight loss is about $7.7 \pm 2.5\%$ (FIG. 3b). Addition of TiO₂ improves stability of CNP glasses. After 7 days weight loss of CNP glass with addition of 3 mol% TiO₂ is only $1.6 \pm 0.6\%$. Addition of 5 mol% TiO₂ causes that CNP glass is very stable and even after 7 days weight loss is not observed.

FIG. 4 shows picture of cell culture wells with cell culture medium (MEM) after 5 min from introduction of analysed glass samples. It is apparent that CNP glasses do not cause change in pH, which is 7.2, i.e. the same as on control TCPS. NBP glass causes acidification of cell culture medium: pH drops to 6.8 for NBP, and it drops again when the NBP structure contains TiO₂: 3%TiO₂ results in pH 6.0 and 5%TiO₂ results in pH 6.2.

Despite of increase in T_g temperature for TiO₂-containing NBP glasses, which could be connected with higher stability of glass structure, results of pH of cell culture medium and also weight loss measurements show that TiO₂ does not cause reinforcement of the NBP glass network. Hence, we observe pH decrease for glasses with TiO₂ addition, as shown by others [19].

The results of pH of PBS as a function of incubation of analysed glasses for 7 days are shown in FIG. 5. Incubation of NBP glass in PBS results in a small increase of pH from 7.2 to 7.5 after 1 h and after 7 days the pH of PBS increases to 8.4 (FIG. 5a). NBP glass containing TiO₂ causes decrease of pH to 7.02 ± 0.05 for NBP with 3 mol% TiO₂ and 6.97 ± 0.05 for NBP with 5 mol% TiO₂ after 7 days (FIG. 5a). The differences in the pH of cell culture medium and PBS can result from the fact that these two media have different chemical compositions. Moreover the ratio of glass mass to medium volume was higher for cell culture medium than for degradation test in PBS. Incubation of CNP glasses (FIG. 5b) in PBS causes slight increase of pH from 7.2 to 7.35-7.55, which is coherent with the results observed for samples incubated in cell culture medium (FIG. 4).

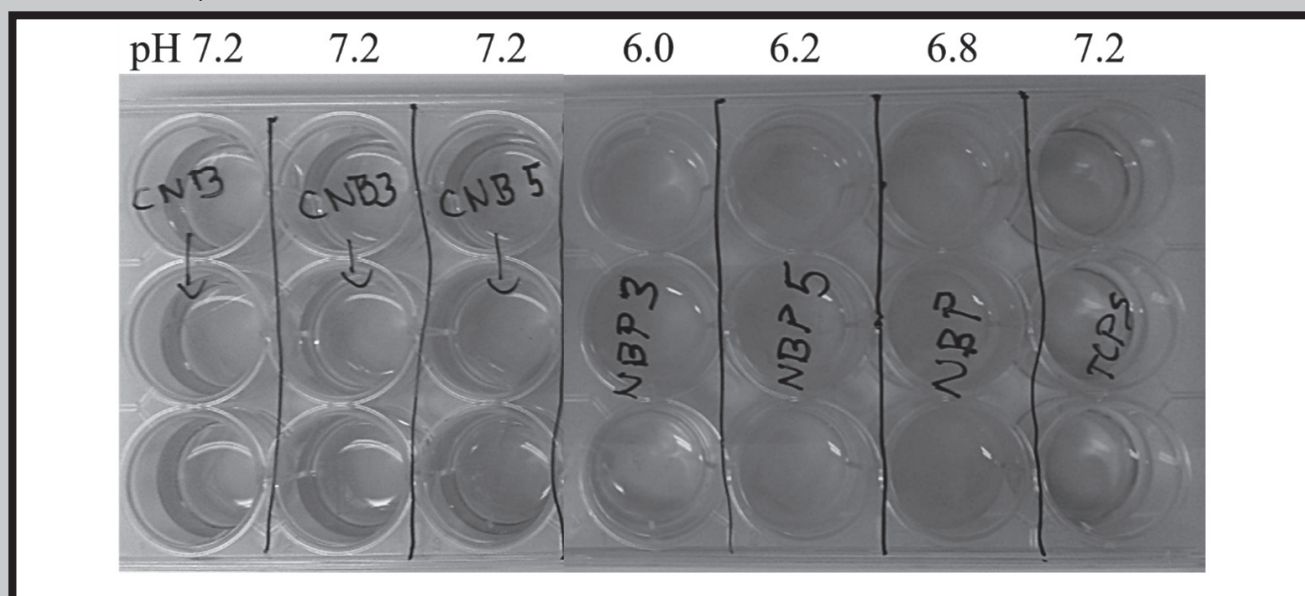


FIG. 4. Picture of cell culture wells containing analysed glasses with cell culture medium (MEM) supplemented with pH indicator phenol red after 5 min from introduction of analysed glass samples. Change in colour indicates pH of medium: CNP – pH 7.2, CNP 3%TiO₂ – pH 7.2, CNP 5%TiO₂ – pH 7.2, NBP – pH 6.8, NBP 3%TiO₂ – pH 6.0, NBP 5%TiO₂ – pH 6.2, and tissue culture polystyrene TCPS – pH 7.2.

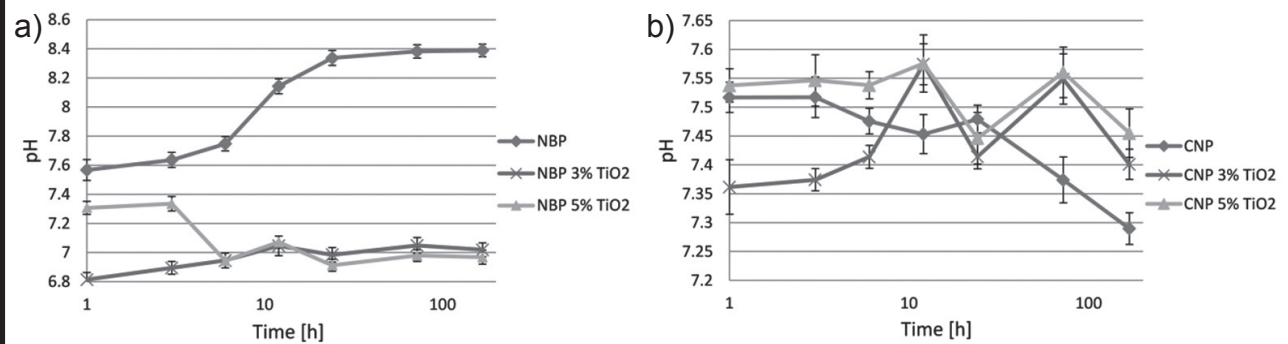


FIG. 5. pH of PBS in contact with glass samples as a function of time: a) NBP type glasses; b) CNP type glasses.

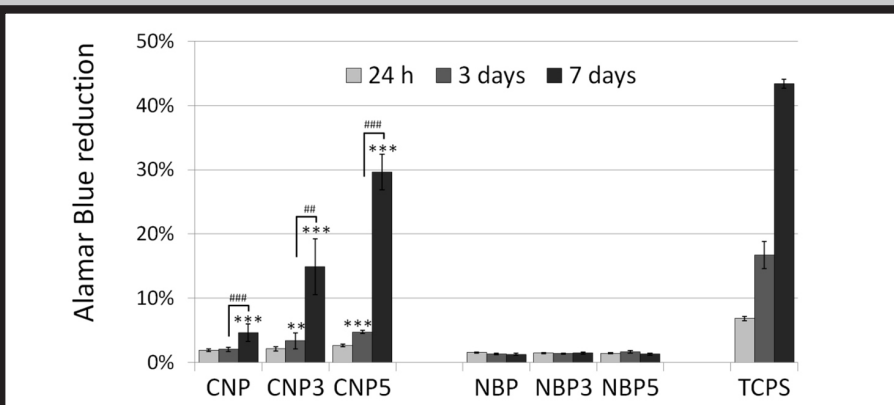


FIG. 6. Viability of MG-63 cells measured by resazurin reduction test. Statistic significant for TCPS is $p < 0.001$ for all samples (not marked in the figure). Asterisks indicate significant differences ($p^{**} < 0.01$ and $p^{***} < 0.001$) compared to control CNP and hashtags indicate significant differences ($p^{##} < 0.01$ and $p^{###} < 0.001$) between day 3 and day 7.

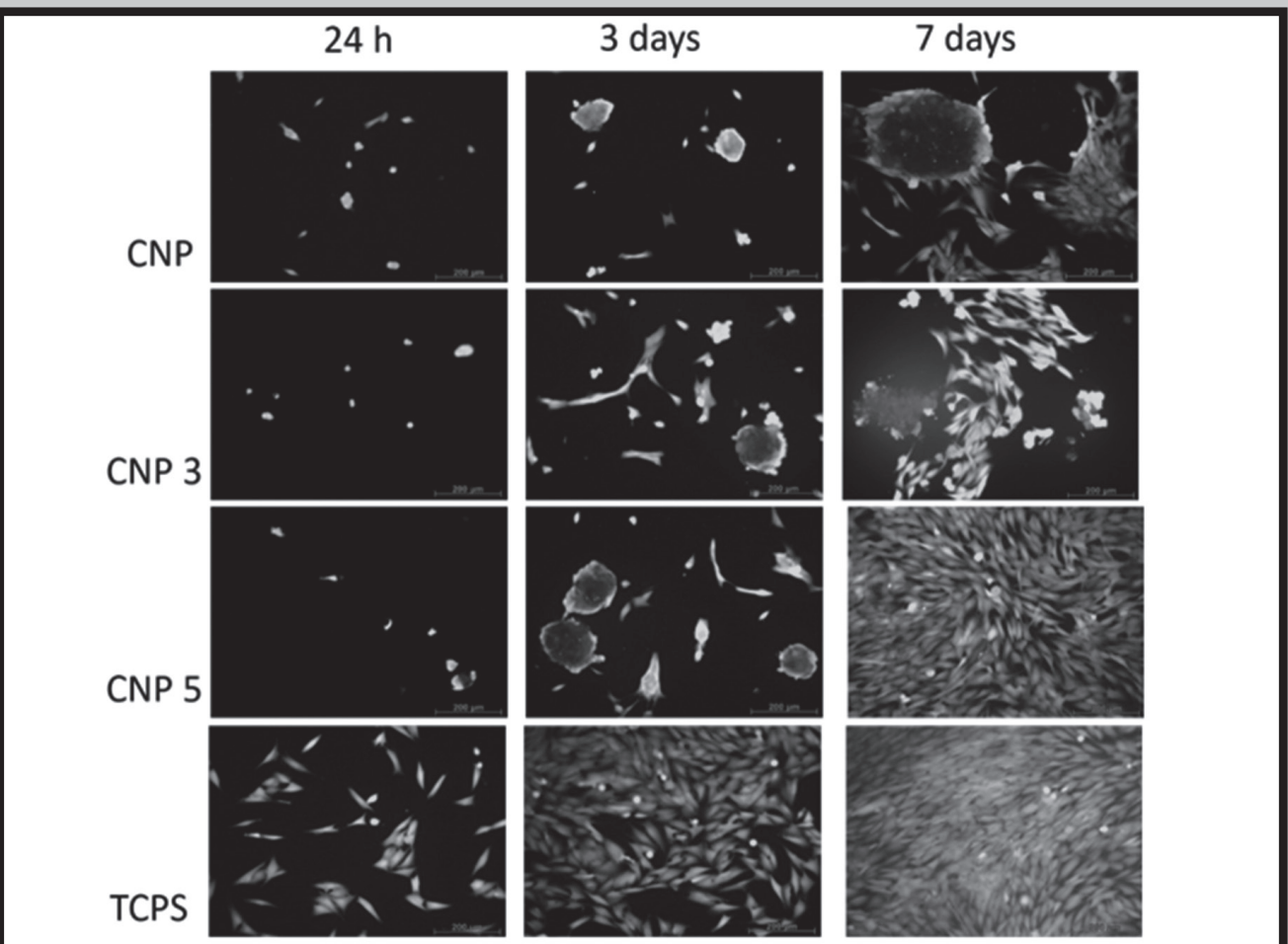


FIG. 7. Morphology and distribution of MG-63 cells stained live/dead on different glasses and control TCPS after 24 h, 3 days and 7 days. Scale bar 100 μm on all pictures.

Biological performance

Cell viability test (FIG. 6) shows that metabolic activity of MG-63 cells for CNP-type samples was reduced as compared to TCPS. The cells showed the tendency to increase their viability with culture time on CNP-type samples with increased concentration of TiO_2 . After 3 and 7 days on CNP3 and CNP5 cell viability was significantly higher than on CNP. CNP5 exhibited the highest viability of cells as compared to CNP and CNP3. On NBP, NBP3 and NBP5 viability of cells was very low. It was due to the fact that the glass samples were dissolved in culture medium and pH of the medium became too acidic for cells to survive (FIG. 4).

FIG. 7 shows morphology of cells on the surface of the glasses stained in green (live cells) and red (dead cells). On CNP-type samples the number of adhered cells was smaller than on TCPS; the cells were round and poorly spread. After 3 days the cells on CNPs grew in agglomerates and some red dead cells were visible, especially inside the agglomerates. After 7 days on CNP5 the cells were homogeneously distributed and formed monolayer (similar to that on TCPS), while on CNP and CNP3 big agglomerates containing both live (green) and dead cells (red) were visible. The number of cells at NBP-type glasses was very low and the observed cells were stained in red, i.e. they were dead (data not shown).

In vitro tests show that CNP-type glasses support adhesion and proliferation of bone cells but NBP-type glasses do not, which is connected with their too rapid degradation in aqueous environment.

Conclusion

We investigated physical and biological properties of glasses from two systems: $\text{Na}_2\text{O}-\text{B}_2\text{O}_3-\text{P}_2\text{O}_5$ (NBP) and $\text{CaO}-\text{Na}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5$ (CNP) as pure and doped with 3 or 5 mol% TiO_2 . Increasing content of TiO_2 caused changing in density, thermal stability and degradation behaviour of glasses. In the case of NBP glass we observed increase in density, glass transitions temperature and melting temperature. Addition of 3 mol% TiO_2 did not increase crystallization temperature. NBP glasses were found to dissolve in aqueous environment and as a result they did not support growth of bone cells.

TiO_2 addition to CNP glasses caused increase in their density, glass transition temperature, crystallization temperature and melting temperature. Compared to NBP glass, increase in these characteristic temperatures was much more significant for CNP glass. This suggests that TiO_2 addition can change the structure of NBP and CNP glasses in a different way, hence we observed various influence of TiO_2 on their physical properties. CNP glasses supported adhesion, growth, proliferation and viability of osteoblast-like cells. The best properties as regards biological performance had CNP5 glass, although adhesion of cells was impeded at shorter time points (24 h, 3 days). Interestingly after 7 days the cells had similar morphology as on control TCPS, however their viability was still significantly lower.

To sum up NBP-type glasses are not suitable support for cell culturing, because they dissolve in cell culture medium and acidify it, provoking cell death, but they can be considered as drug delivery systems. On the other hand CNP-type glasses (especially those containing 5% TiO_2) can be used as a substrate for bone tissue engineering scaffolds. However further studies are needed to provide more clinically relevant evidences in this matter.

Acknowledgements

The financial support was provided from MAESTRO Project (2011/02/A/ST5/00471) from National Science Centre, Poland and from statutory works (11.11.160.616) of AGH University of Science and Technology (Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials).

References

- [1] Khan Y., Yaszemski M.J., Mikos A.G., Laurencin C.T.: Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. The Journal of bone and joint surgery: American volume 90 (2008) 36-42.
- [2] Sheikh Z., Sima C., Glogauer M.: Bone Replacement Materials and Techniques Used for Achieving Vertical Alveolar Bone Augmentation. Materials 8 (2015) 2953-2993.
- [3] Rahaman M. N., Day D.E., Bal B.S., Fu Q., Jung S.B., Bonewald L.F., Tomsia A.P.: Bioactive glass in tissue engineering. Acta Biomaterialia 7 (2011) 2355-2373.
- [4] Gerhardt L.C., Boccaccini A.R.: Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Materials 3 (2010) 3867-3910.
- [5] O'Brien F.J.: Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today 14 (2011) 88-95.
- [6] Hench L.L.: Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications. New Journal of Glass and Ceramics 3 (2013) 67-73.
- [7] Nazarpour S.: Thin Films and Coatings in Biology, Springer 2013.
- [8] Abou Neel E.A., Pickup D.M., Valappil S.P., Newport R.J., Knowles J.C.: Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses. Journal of Materials Chemistry 19 (2009) 690-701.
- [9] Lin L., Zhang L., Wang J., Xie K., Yang X., Chen X., Yang G., Gao C., Gou Z.: Low-temperature sintering of 45S5 Bioglass-based glass ceramics: Effect of biphasic mixing approach on the mechanical and biological properties. Materials Letters 126 (2014) 154-158.
- [10] Kiani A., Lakhka N.J., Salih V., Smith M.E., Hanna J.V., Newport R.J., Pickup D.M., Knowles J.C.: Titanium-containing bioactive phosphate glasses. Philosophical Transactions of the Royal Society A 370 (2012) 1352-1375.
- [11] Placek L.M., Keenan T.J., Li Y., Yatongchai C., Pradhan D., Boyd D., Mellott N.P., Wren A.W.: Investigating the effect of TiO_2 on the structure and biocompatibility of bioactive glass. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials (2015).
- [12] Abou Neel E.A., Knowles J.C.: Physical and biocompatibility studies of novel titanium dioxide doped phosphate-based glasses for bone tissue engineering applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19 (2008) 377-386.
- [13] Gajc M., Surma H.B., Klos A., Sadecka K., Orliński K., Nikolaenko A.E., Zdunek K., Pawlak D.A.: Nanoparticle Direct Doping: Novel Method for Manufacturing Three-Dimensional Bulk Plasmonic Nanocomposites Advanced Functional Materials 23 (2013) 3443-3451.
- [14] Kim D., Hwang C., Gwoo D., Kim T., Kim N., Ryu B.K.: Effect of titanium on structure of sodium borophosphate glasses. Electronic Materials Letters 7 (2011) 343-347.
- [15] Rajendran V., Gayathri Devi A.V., Azooz M., El-Batal F.H.: Physicochemical studies of phosphate based $\text{P}_2\text{O}_5-\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{TiO}_2$ glasses for biomedical applications. Journal of Non-Crystalline Solids 353 (2006) 77-84.
- [16] Fawcett V., Taylor L.H., Proceedings of the Fifth International Conference on Raman Spectroscopy, Freiburg, Germany 1976, 112.
- [17] Carta D., Qiu D., Guerry P., Ahmed I., Abou Neel E.A., Knowles J.C., Smith M.E., Newport R.J.: The effect of composition on the structure of sodium borophosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids 354 (2008) 3671-3677.
- [18] Navarro M., Ginebra M.P., Planell J.A., Barrias C.C., Barbosa M.A.: In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. Acta Biomaterialia 1 (2005) 411-419.
- [19] Novajra G., Vitale-Brovvarone C., Knowles J.C., Maina G., Aina V., Ghigo D., Bergandi L.: Effects of TiO_2 -containing phosphate glasses on solubility and in vitro biocompatibility. Journal of Biomedical Materials Research Part A 99 (2011) 295-306.

OCENA STOPNIA PROLIFERACJI KOMÓREK OSTEOLASTO-PODOBNYCH W KONTAKCIE Z POWIERZCHNIAMI STOPU TYTANU PO PIASKOWANIU DO RÓŻNEGO STOPNIA CHROPOWATOŚCI

DOROTA BOCIĄGA*, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI,
ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ
*E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA@P.LODZ.PL

Streszczenie

Tytan i jego stopy są jednymi z najpopularniejszych biomateriałów metalicznych stosowanych w dzisiejszej implantologii. Mimo licznych zalet tych materiałów, wykonane z nich wszczepy często poddaje się dodatkowej obróbce powierzchni, której celem jest polepszenie integracji implantu z otaczającymi go tkankami. Spośród wielu dostępnych technik, jedną z najczęściej wykorzystywanych komercyjnie jest stosunkowo tania i szybka metoda piaskowania, polegająca na wystawianiu danego przedmiotu na kontakt ze strumieniem przyspieszonych cząstek materiału ściernego. Celem tej pracy była analiza wpływu piaskowania ścierniwem o różnej średnicy ziaren na właściwości obrabianej powierzchni elementów na bazie dwóch popularnych stopów tytanu: Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb. W celu scharakteryzowania uzyskanych powierzchni przeprowadzono badania ich topografii, składu chemicznego, chropowatości i zwilżalności. Ponadto, aby sprawdzić potencjalną reakcję organizmu na obecność obrobionych w ten sposób elementów dokonano oceny stopnia proliferacji ludzkich komórek kościotwórczych hodowanych w bezpośrednim kontakcie z przygotowanymi powierzchniami. Otrzymane wyniki wykazały wyraźną zależność pomiędzy stopniem chropowatości i składem chemicznym piaskowanych elementów, a zastosowanym do obróbki rodzajem medium ściernego. Badanie zachowania komórek będących w kontakcie z modyfikowanymi próbkami wykazało obniżoną skłonność osteoblastów do przylegania i namnażania na najbardziej chropowatych powierzchniach.

Słowa kluczowe: piaskowanie, osteoblasty, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, obróbka powierzchniowa

[Inżynieria Biomateriałów 134 (2016) 8-17]

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy są materiałami szeroko rozpowszechnionymi w zastosowaniach biomedycznych, gdzie przede wszystkim służą jako elementy zastępujące zniszczone fragmenty układu kostnego. Popularność tych materiałów wynika głównie z niezwykle korzystnej kombinacji ich cech wytrzymałościowych i korozyjnych oraz, co bardzo istotne w przypadku biomateriałów, dużej biogodności. Przez lata stop Ti-6Al-4V był jednym z najczęściej stosowanych w implantologii stopów tytanu.

EVALUATION OF PROLIFERATION RATE OF OSTEOLAST-LIKE CELLS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY SURFACES SANDBLASTED TO DIFFERENT ROUGHNESS LEVEL

DOROTA BOCIĄGA*, ANNA OLEJNIK, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI,
ANNA SOBCZYK-GUZENDA, JUSTYNA PARADOWSKA

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY,
LODZ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 LODZ, POLAND
*E-MAIL: DOROTA.BOCIAGA@P.LODZ.PL

Abstract

Titanium and its alloys are very popular metallic biomaterials used for medical implants production. Despite numerous advantages of the bulk material, such implants are very often subjected to additional surface treatment in order to improve their integration within the body tissues. Besides many other available techniques, one of the most frequently used in the commercial sector is a fast and economically profitable process of abrasive blasting. It is a method in which a stream of accelerated particles collides with the implant surface what causes changes in the material properties. The following paper presents differences resulting from sandblasting of Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens with blasting particles varying in size. In order to characterize the outcome of such the treatment, investigations of surface topography, chemical composition, roughness, and wettability were conducted. Finally, the behaviour of the osteoblast-like cells adhered to the sandblasted Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb surfaces was assessed in order to evaluate potential body response towards the aforementioned materials. The results suggest a strong correlation between surface roughness, its chemistry and the type of blasting medium applied. Evaluation of the cell culture revealed a rapid decrease in cell proliferation rate onto the roughest surfaces.

Keywords: sandblasting, osteoblasts, Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, surface treatment

[Engineering of Biomaterials 134 (2016) 8-17]

Introduction

Titanium and its alloys are widely applied in implant devices where they help to replace failed bone tissue. The usability of those materials is mainly due to their favourable properties, such as biocompatibility, high corrosion resistance and mechanical characteristics. For a long time, Ti-6Al-4V biomaterials have been the most commonly used titanium alloys in medicine. However, as they appear to cause a possible toxic effect resulting from vanadium release, for the permanent implant applications vanadium-free alloys like Ti-6Al-7Nb are being introduced to the market now [1].

Mając jednak na uwadze jego potencjalne toksyczne działanie wywołane uwalnianiem wanadu do organizmu, coraz częściej – zwłaszcza w zastosowaniach długoterminowych – proponuje się użycie stopów bezwanadowych, na przykład stopu Ti-6Al-7Nb [1].

Uwzględniając fakt, iż każdy wszczep kontaktuje się z otaczającymi go w ciele pacjenta tkankami i płynami fizjologicznymi poprzez swoją powierzchnię zauważono, że właściwości materiału litego, z którego element jest wykonany nie są jedynymi czynnikami wpływającymi na reakcje zachodzące na granicy implant-środowisko zewnętrzne. Okazuje się bowiem, że równie istotna jest charakterystyka samej powierzchni, jej właściwości fizyczne, chemiczne i mechaniczne oraz topografia. Spośród wielu prowadzonych w tej dziedzinie badań, duża część prac skupia się na wpływie chropowatości na inne właściwości powierzchni, między innymi na zmiany w składzie chemicznym, zwilżalność i zdolność do uwalniania jonów. Na ogół przyjmuje się, że powierzchnie bardziej chropowate stymulują wzrost potencjału biomechanicznego kontaktu na granicy implantu i kości. Wszczyepy o większej chropowatości wykazują większe rozwinięcie powierzchni, co powoduje, że mogą być lepiej i szybciej zakotwiczone w tkance kostnej, skracając tym samym czas potrzebny do pełnego zagojenia się operowanego miejsca [2]. Wiele prowadzonych dotychczas badań *in vivo* dowiodło, że zdolność implantu do integracji z otaczającymi go tkankami jest pozytywnie skorelowana ze wzrostem chropowatości jego powierzchni [3-5]. Rozwinięcie powierzchni właściwej implantów wspomaga również adsorpcję białek zapoczątkowujących proces osteointegracji [6]. Wykazano także, że chropowate wszczyepy na bazie tytanu mają zdolność kontrolowania zachowania osteoblastów (komórek formujących kość), wpływając na ich adhezję do powierzchni implantu oraz dalszą aktywność enzymatyczną [7,8].

Znalezienie sposobu na szybkie i pełne zintegrowanie implantu z otaczającym go środowiskiem jest kwestią kluczową dla ograniczenia czasu, który musi upłynąć od operacji do momentu, kiedy wszczep staje się w pełni funkcjonalny. Uwzględniając jak duże znaczenie mają właściwości powierzchniowe implantu, wiele metod modyfikacji powierzchni dostępnych od lat w różnych sektorach przemysłu zostało dostosowanych do specyficznych potrzeb inżynierii biomedycznej. Przykładem takiej obróbki jest właśnie piaskowanie. Proces ten opiera się na bombardowaniu obrabianego elementu strumieniem twardych cząstek o dużej prędkości, które uderzają w powierzchnię i usuwają część znajdującego się tam materiału, zmieniając tym samym jej właściwości. W roli ścierniwa używa się zazwyczaj piasku z węgla krzemu (SiC), szklanych kulek, suchego lodu, śrutu metalowego, cząstek tlenku glinu (Al_2O_3), krzemionki (SiO_2) bądź innych ścierniwi proszkowych [9]. Z punktu widzenia aplikacji biomedycznych, najważniejszym zastosowaniem procesu piaskowania wydaje się być możliwość zwiększania stopnia chropowatości elementów poddawanych obróbce. Ponadto, technika ta dobrze sprawdza się też w oczyszczaniu powierzchni, a także przyczynia się do powierzchniowego umocnienia materiału, wprowadzając pożądane naprężenia ściskające na skutek lokalnego plastycznego odkształcenia materiału [9,10].

Powierzchnie poddawane piaskowaniu wykazują wyższą energię powierzchniową świadczącą o większej aktywności chemicznej i fizycznej otrzymanej warstwy wierzchniej [10]. Ze względu na swoje liczne zalety, w tym szybkość, łatwość obsługi i cenę, piaskowanie jest powszechnie używane do czyszczenia i nadawania chropowatości implantom dostępnym komercyjnie, na przykład implantom stomatologicznym, częściom rozruszników serca i trzpieniom endoprotez stawu biodrowego. Metoda ta niesie jednak ze sobą niebezpieczeństwo odkładania się pozostałości procesowych.

Owing to the fact that every implanted medical device is in direct contact with surrounding body tissues and physiological fluids, it was noticed that the properties of the bulk material are not the only factor influencing the implant-body interactions. Characteristics of the implanted element surface, its chemical, physical and mechanical properties are a crucial aspect as well. As a result, a lot of studies focus on surface roughness and its consequential changes in surface chemistry, wettability, ion release, etc. It is generally expected that the rougher surfaces promote faster and more successful regeneration. The increased roughness level results in higher specific surface area, causing the implant to be better anchored in the bony tissue [2]. Many *in vivo* studies have already proved that integration of the implants is positively correlated with rising implant surface roughness [3-5] and that an increase in the effective surface area of the titanium implants enhances the biomechanical potential of implant-bone interfaces, improving adsorption of proteins to the implant's surface [6]. The rough titanium-based surfaces also appeared to control behaviour of the osteoblasts (bone forming cells) by influencing their adhesion to the surface and further enzymatic activity [7,8].

Finding a proper way to effectively improve integration of the implant with body tissues is crucial for shortening the time interval between the surgery and a moment when the device becomes fully usable. Concerning the importance of the surface properties, a plethora of various surface treatments commonly accessible in different branches of the industry have been rearranged to serve in the biomedical sector. One of such a method is the process of abrasive blasting traditionally called sandblasting. This technique is based on the bombardment of the element to be modified by hard particles of high velocity and as a result, part of the material is excluded from material surface. For hard solid material forced across the surface one may use carborundum (SiC) grits, glass beads, dry ice, metal pellets, alumina (Al_2O_3), silica (SiO_2) and other powdered abrasives [9]. From the biomedical point of view, one of the most relevant functions of sandblasting is its ability to roughen the modified elements. The process may be also applied in order to remove surface contamination. Finally, sandblasting could be profitable from the mechanical point of view as it produces beneficial surface compressive residual stresses by introducing local plastic deformation of the treated material [9,10].

The surfaces finished with abrasive blasting exhibit higher surface energy, indicating higher surface chemical and physical activities [10]. Due to their numerous benefits, mainly short processing time and relatively small costs, the blasting techniques are commonly used for cleaning and surface roughening of commercial implants like dental implants, pacemakers and femoral stems. It must be noted however that medium particles used for bombardment of the surface are likely to become embedded in the material, especially in plastic one like titanium, and then to be released to the physiological fluids in the body [11]. In order to reduce possible effect of ion release and at the same time to ensure sufficient surface roughness, the biomedical devices are sandblasted with particular size of the abrasive medium, mostly with particles between 25 and 250 μm [12]. Therefore, the main objective of the following paper is to verify the influence of the blasting particles diameter within the abovementioned size range on the characteristics of the sandblasted surfaces and potential biological response of the host organism was evaluated within this study.

Jest to szczególnie niebezpieczne w przypadku piaskowania miękkich materiałów, na przykład tytanu, gdzie cząstki ścierniwa mogą łatwo wbudować się w strukturę powierzchni i być z niej uwalniane z czasem, kiedy implant znajdzie się w otoczeniu tkanek i płynów fizjologicznych pacjenta [11]. W celu ograniczenia tego zjawiska, ale przy jednoczesnym zachowaniu odpowiedniego stopnia chropowatości powierzchni, zalecane jest, by implanty medyczne piaskować ścierniwem, którego rozmiar mieści się w określonym przedziale, najczęściej od 25 do 250 μm [12]. Celem tej pracy jest sprawdzenie, jak rozmiar cząstek ze wspomnianego wyżej zakresu wpływa na charakterystykę piaskowanej powierzchni i potencjalną odpowiedź organizmu mającego kontakt z modyfikowanym w ten sposób implantem.

Materialy i metody

Przygotowanie próbek

Do badania użyto dwóch komercyjnie dostępnych stopów tytanu: Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb (Bibus Metals, Polska), spełniających odpowiednio normy ASTM B348 i ASTM F1295. Cylindryczne próbki (16 mm średnicy, 6 lub 8 mm grubości) stopów poddano szlifowaniu papierami ściernymi z ziarnami SiC o różnej gradacji i polerowaniu przy pomocy koloidalnej zawiesiny SiO_2 (Struers). Próbki każdego ze stopów podzielono na cztery zestawy, a każdy z nich poddano piaskowaniu przy pomocy cząstek tlenku glinu o różnej wielkości (KOS, Polska). Zakres rozmiarów użytego ścierniwa prezentuje TABELA 1. Proces piaskowania wykonano w piaskarce ALOX 2001 (EFFEGI BREGA, Włochy) wykorzystując strumień cząstek ścierniwa o ciśnieniu równym 4 bary. Czas modyfikacji każdej z próbek wynosił 10 minut. Jako próbki kontrolne wykorzystano polerowane mechanicznie krążki Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb. Wszystkie próbki oczyszczono w acetonie (5 min), alkoholu (10 min) i wodzie destylowanej (5 min) z wykorzystaniem myjki ultradźwiękowej i osuszono przy użyciu sprężonego powietrza. Przed przeprowadzeniem badań próbki zostały poddane sterylizacji parowej w temperaturze 127°C.

TABELA 2. Oznaczenia badanych próbek.

TABLE 2. Samples abbreviations used in the study.

	próbka kontrolna (polerowana) reference sample (mechanically polished)	komplet piaskowany I blasted series I	komplet piaskowany II blasted series II	komplet piaskowany III blasted series III	komplet piaskowany IV blasted series IV
Ti-6Al-4V	Ti+V/mp	Ti+V/s.200	Ti+V/s.115	Ti+V/s.60	Ti+V/s.45
Ti-6Al-7Nb	Ti+Nb/mp	Ti+Nb/s.200	Ti+Nb/s.115	Ti+Nb/s.60	Ti+Nb/s.45

Zgodnie z rodzajem użytego biomateriału i rozmiarem cząstek ścierniwa, seriom próbek nadano odpowiednie oznaczenia. Odwołania do poszczególnych przypadków będą w kolejnych sekcjach czynione w sposób zaprezentowany w TABELI 2. Przypisane seriom numery (s.200, s.115, s.60, s.45) odpowiadają uśrednionemu rozmiarowi cząstek z wymienionych wcześniej w TABELI 1 zakresów wielkości.

Analiza powierzchni

Ocenę morfologii i składu chemicznego piaskowanych powierzchni dokonano z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego SEM JSM-6610LV (JEOL, USA) zaopatrzonego w przystawkę X-MAX 80 EDS (Oxford Instruments, UK). Parametry chropowatości wyliczono na podstawie pomiarów profilometrem (JENOPTIK, Niemcy) na odcinku o długości 4,8 mm. Wykonano również badanie zwilżalności modyfikowanych powierzchni oceniając geometrię umieszczonych na nich kropli wody (FM40 Easy Drop, KRÜSS, Niemcy). Wszystkie pomiary wykonane były na trzech różnych próbkach tego samego typu.

Materials and Methods

Substrate preparation

The study was conducted on two commercially available titanium-based alloys Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb (Bibus Metals, Poland) that conformed ASTM B348 and ASTM F1295 standard, respectively. Disks of 16 mm in diameter, 6 to 8 mm thick of both alloys were initially ground with silicon carbide (SiC) papers and polished with colloidal silica (SiO_2) suspension (Struers). Concerning the metal alloy used, the samples were divided into four subgroups and subjected to sandblasting with Al_2O_3 particles (KOS, Poland) of different sizes (TABLE 1). The process was carried out in an ALOX 2001 sandblaster (EFFEGI BREGA, Italy) under pressure of 4 Bars for about 10 min for each sample. As the reference samples, specimens of mechanically polished Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb were used. All the prepared specimens were ultrasonically cleaned in acetone (5 min), alcohol (10 min), distilled water (5 min) and afterwards dried with the compressed stream of air. Before further examination, all samples were steam sterilized at 127°C.

TABELA 1. Rozmiary cząstek użytego ścierniwa.
TABLE 1. Size ranges of the blasting medium.

komplet series	rozmiar cząstek Al_2O_3 size of Al_2O_3 particles
komplet I / series I	180-212 μm
komplet I / series II	106-125 μm
komplet I / series III	53-75 μm
komplet I / series IV	44-46 μm

The samples were given abbreviations according to the used alloy and size of the abrasive particles, as presented in TABLE 2. The assigned numbers (s.200, s.115, s.60, s.45) indicate the average micrometre size of the abrasive particles taken from the size ranges presented in TABLE 1.

Surface analysis

The morphology and chemical composition of the sandblasted samples were investigated with the use of a scanning electron microscope SEM JSM-6610LV (JEOL, USA) equipped with X-MAX 80 EDS analyzer (Oxford Instruments, UK). For the roughness evaluation, profilometer (JENOPTIK, Germany) measurements with the sampling length equal to 4.8 mm were applied. Additionally, surface wettability was assessed with the use of sessile drop technique and FM40 Easy Drop system (KRÜSS, Germany). All the measurements were carried out on three different specimens of the same kind.

Hodowla komórkowa

Właściwości biologiczne rozpatrywanych biomateriałów oceniono w teście live/dead (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes), za pomocą którego określono cytotoksyczność piaskowanych powierzchni oraz poziom proliferacji ludzkich komórek osteoblastopodobnych Saos-2 hodowanych z nimi w bezpośrednim kontakcie. Do badania każdego kompletu użyto dwóch osobnych próbek danego typu, na które naniesiono zawiesinę komórek o początkowej gęstości wysiania 30 000 komórek/cm². Jako próbki kontrolne dla tego doświadczenia użyto komórki nie poddane kontaktowi z żadnym biomateriałem metalicznym oraz komórki kontaktujące się z próbką polerowanej stali austenitycznej AISI 316L. Wyniki testu zebrano po 48 godzinach inkubacji. Zaadherowane do powierzchni próbek komórki oglądano przy użyciu metalurgiczno-biologicznego mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus GX 71) przy 10-krotnym powiększeniu. W celu rozróżnienia komórek żywych i martwych użyto dwóch barwników fluorescencyjnych, tj. kalceiny i bromku etydyny. Wyniki liczbowe prezentowane w kolejnych sekcjach przedstawiają średnią liczbę komórek zaobserwowanych w polu widzenia dla pięciu przypadkowych obszarów na każdej z próbek, po odrzuceniu dwóch skrajnych wyników z otrzymanej puli danych.

Analiza statystyczna

Do oceny istotności statystycznej badanych wyników testu barwienia live/dead użyto jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Porównano stopień proliferacji komórek dla użytego tytanowego podłoża stopowego w każdym z rozpatrywanych przypadków obróbki, a także różnice wynikające z zastosowania różnych metod traktowania powierzchni w obrębie tego samego biomateriału. Za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $p < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Morfologię analizowanych powierzchni przedstawiają mikrografie SEM na RYS. 1. Badania nie ujawniły znaczących różnic wynikających z rodzaju piaskowanego podłoża, tj. stopów Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb (RYS. 1 a-h), jednakże zaobserwowano zmianę struktury w zależności od wielkości cząstek ścierniwa, którym piaskowane były poszczególne próbki. Wraz z rosnącym rozmiarem cząstek ścierniwa rosła chropowatość obrabianych powierzchni. Chropowatość wszystkich piaskowanych próbek była znacznie wyższa od próbek kontrolnych (RYS. 1 i,j).

Analiza EDS badanych powierzchni dowiodła, że piaskowanie może zmieniać skład chemiczny traktowanych tą metodą powierzchni. Jak odwzorowane w wielkości pików dla glinu (Al) oraz tlenu (O) w przykładowych widmach EDS badanych próbek (RYS. 2), piaskowane powierzchnie charakteryzowały się zwiększoną zawartością tych dwóch pierwiastków w porównaniu do próbek polerowanych mechanicznie. Ponadto, prócz zmienionego składu podstawowych elementów stopowych, każda z piaskowanych próbek zawierała na swojej powierzchni dodatkowy pierwiastek – sód (Na) lub krzem (Si). Uwzględniając fakt, że analiza wykonana była przy zachowaniu tej samej odległości roboczej dla każdej z próbek, zaobserwowane zjawisko należy tłumaczyć faktem, że cząstki użytego w piaskowaniu ścierniwa wbudowały się w strukturę piaskowanej powierzchni, stając się tym samym pozostałością po procesowaniu.

Cell culture

Cell proliferation and surface cytotoxicity of the prepared biomaterials were assessed with the use of live/dead test (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit, Molecular Probes) on osteoblast-like Saos-2 cells cultured over the prepared surfaces with the initial seeding density equal to 30 000 cells/cm². The experiment was conducted on two different samples of the same kind. Cells not exposed to the contact with any metallic biomaterial as well as cells contacting with the mechanically polished austenitic stainless steel (AISI 316L) sample were used as the control sets. The proliferative activity of the cultured cells was determined after 48 h from the initial seeding. The observations were carried out with the use of a fluorescence microscope (Olympus GX 71, magnification $\times 10$) and fluorescent markers, namely calcein AM and ethidium bromide. The quantitative results presented in further sections comprise the average number of cells calculated from the images acquired in five different spots on each of the investigated specimens, without two extreme values excluded from the obtained data set.

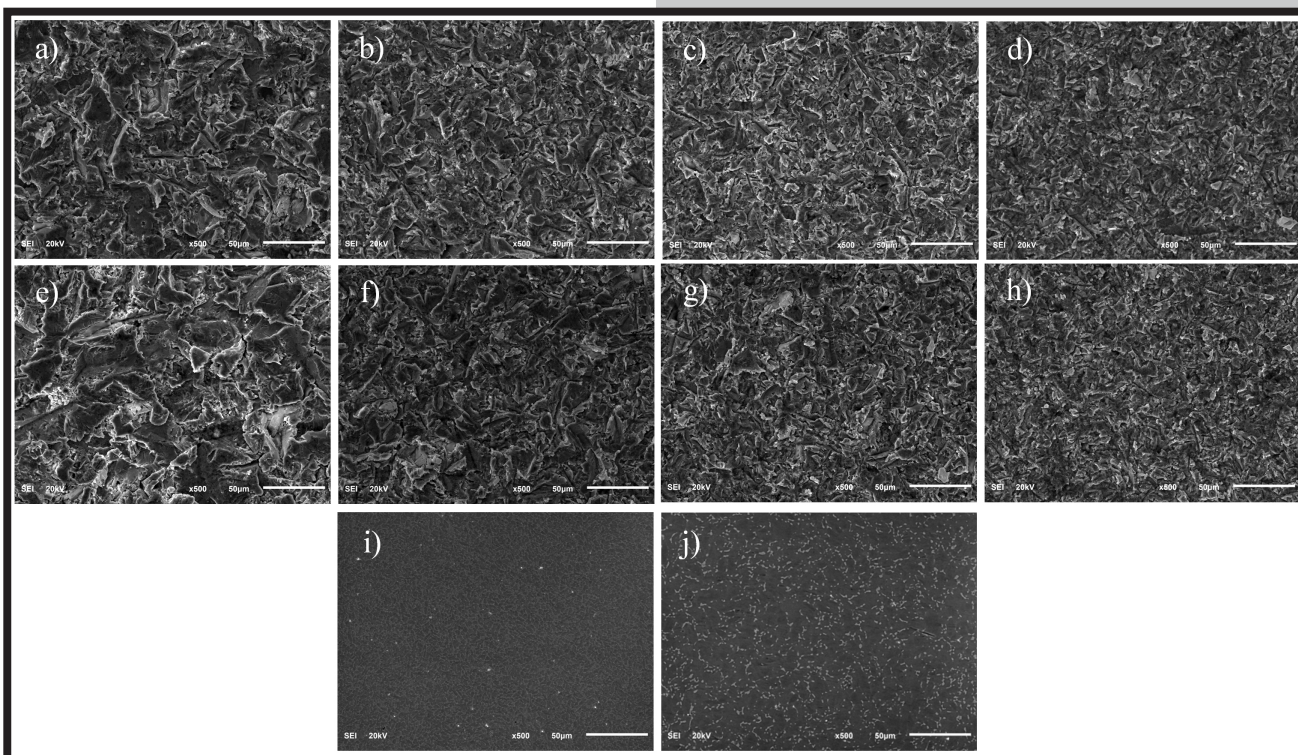
Statistical analysis

The statistical analysis of the results obtained in the live/dead test was carried out using one-way analysis of variance (ANOVA). One compared the proliferation level of cells due to the type of titanium alloy used as well as the differences resulting from the applied surface treatment for both materials. Results with $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results and Discussions

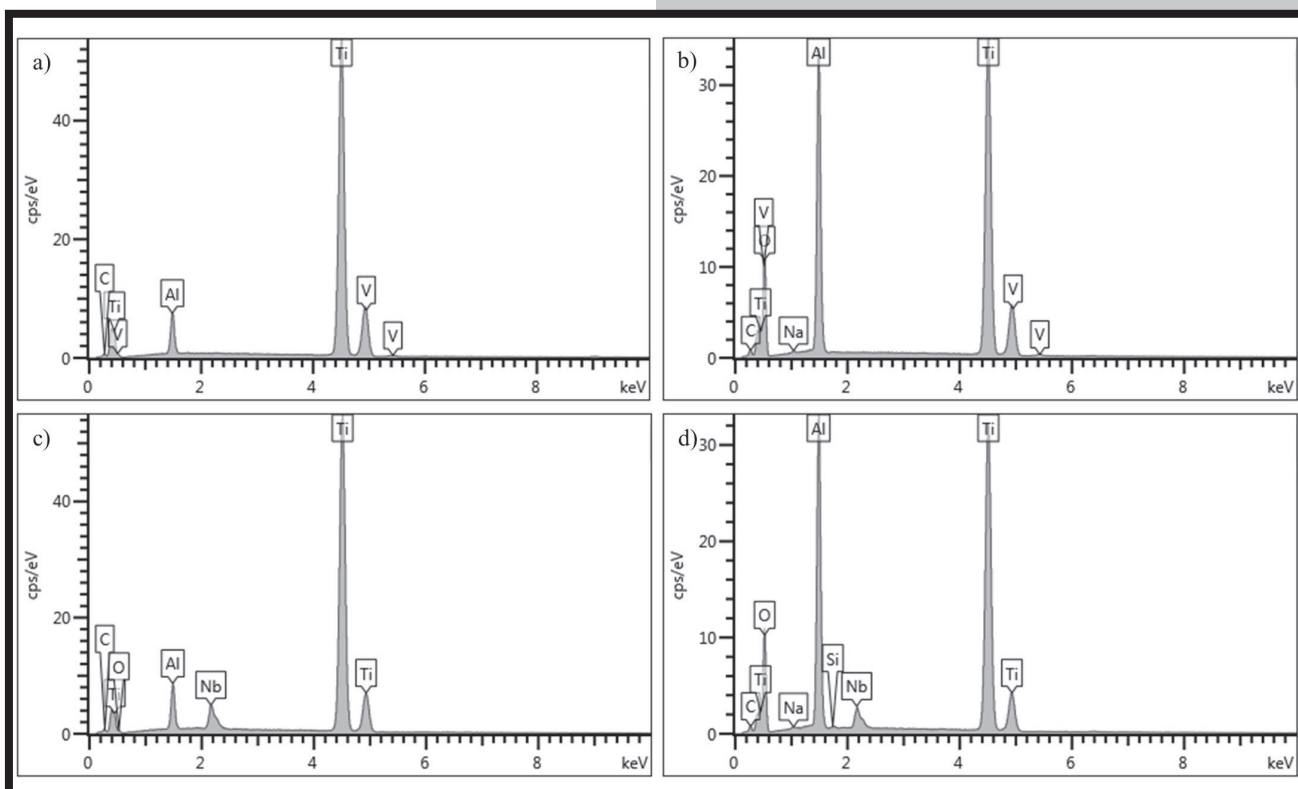
SEM investigation of the specimens did not reveal any significant discrepancies in the surface morphology of the sandblasted Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb samples (FIG. 1 a-h). However, changes in surface structure depending on the size of the applied blasting medium could be observed. Moreover, it could be noticed that with the increasing size of the particles, the roughness of the surface was higher as well. Simultaneously, the roughness of the sandblasted surfaces was significantly higher than for the reference mechanically polished samples (FIG. 1 i,j).

The results of the EDS analysis proved that the process of sandblasting may influence the chemical composition of the samples surface. As indicated by the higher peaks for aluminium (Al) and oxygen (O) in the presented EDS spectra (FIG. 2), the sandblasted surfaces appeared to contain increased contribution of those two elements in comparison to the mechanically polished samples. Apart from the changed ratio of the basic alloying elements, in all of the sandblasted cases some additional elements like sodium (Na) or silicone (Si) were present as well. According to the fact that all the measurements were taken with the same working distance for each specimen, such a phenomenon is expected to be a direct result of sandblasting. The abrasive particles could be embedded into the surface material during the treatment.



RYS. 1. Mikrografie SEM przygotowanych powierzchni: Ti+V/s.200 (a), Ti+V/s.115 (b), Ti+V/s.60 (c), Ti+V/s.45 (d), Ti+Nb/200 (e), Ti+Nb/s.115 (f), Ti+Nb/s.60 (g), Ti+Nb/s.45 (h), Ti+V/mp (i), Ti+Nb/mp (j).

FIG. 1. SEM micrographs of the prepared surfaces: Ti+V/s.200 (a), Ti+V/s.115 (b), Ti+V/s.60 (c), Ti+V/s.45 (d), Ti+Nb/200 (e), Ti+Nb/s.115 (f), Ti+Nb/s.60 (g), Ti+Nb/s.45 (h), Ti+V/mp (i), Ti+Nb/mp (j).

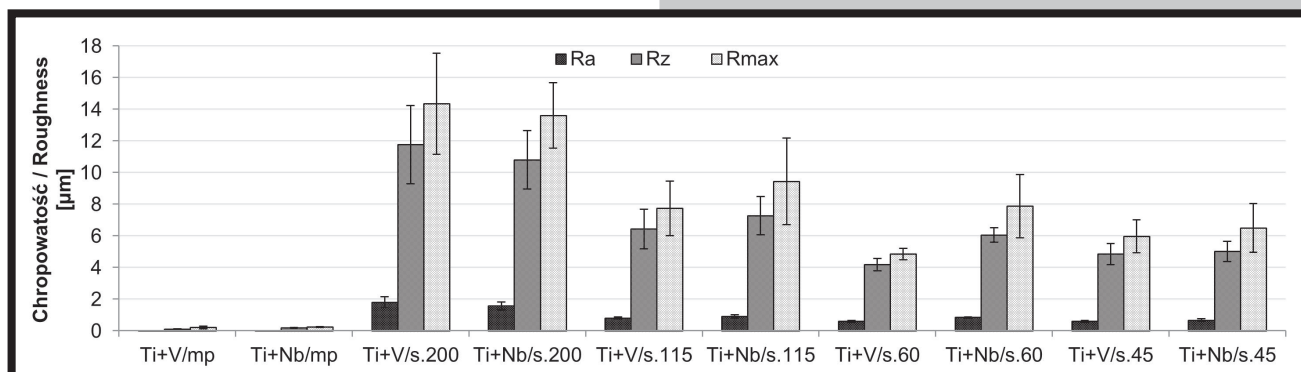


RYS. 2. Widma EDS dla próbek Ti-6Al-4V i Ti-6Al-7Nb polerowanych mechanicznie (a, c) oraz piaskowanych (b, d).

FIG. 2. EDS spectra for mechanically polished (a, c) and sandblasted (b, d) Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens.

Kolejną z określonych właściwości przygotowanych powierzchni była ich chropowatość. W wyniku badania profilometrem wyznaczono trzy parametry: średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości na długości odcinka pomiarowego (Ra), wysokość chropowatości według pięciu najwyższej i pięciu najniższej położonych punktów profilu (Rz) oraz maksymalną wysokość chropowatości ($Rmax$). Wyniki pomiarów zaprezentowane na RYS. 3 potwierdzają obserwację SEM – najbardziej chropowate powierzchnie to te, które poddano działaniu ścierniwa o największej średnicy ziarna. Ponadto próbki piaskowane coraz drobniejszym piaskiem stają się gładziej, osiągając niższe wartości średniego arytmetycznego odchylenia profilu chropowatości. Jak można również zaobserwować, w większości przypadków (serie próbek s. 115, s. 60, s. 45), powierzchnie na bazie stopu z niobem miały niższą chropowatość.

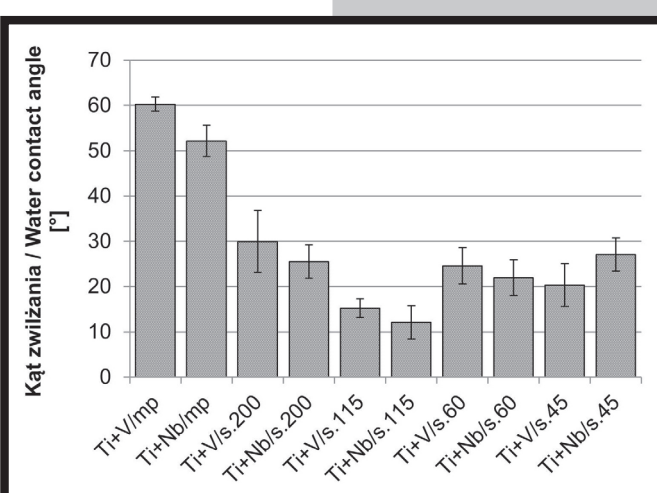
Concerning the examination of further surface characteristics, surface roughness of the prepared samples was evaluated using three distinctive parameters: arithmetical mean deviation of the roughness profile (Ra), ten point average roughness (Rz), and maximum roughness height within a sampling length ($Rmax$). The results presented in FIG. 3 confirmed the SEM observations. The roughest surfaces in terms of the highest Ra parameters were obtained by treating the samples with the biggest blasting particles. The roughness decreased with decreasing blasting particle size. It may be also noticed that for the majority of the blasting sample series (s. 115, s. 60, s. 45), the surfaces of the niobium-containing alloy were rougher than the surfaces of the vanadium-containing alloy. The mechanically polished samples were characterized by very low roughness values.



RYS. 3. Chropowatość badanych powierzchni.
FIG. 3. Roughness of the examined surfaces.

Ocenione pod kątem chropowatości i składu chemicznego próbki zostały poddane badaniu zwilżalności przez wodę metodą siedzącej kropli. Otrzymane wyniki (RYS. 4) wskazują, że niezależnie od zastosowanej metody obróbki wszystkie powierzchnie były hydrofilowe, jako że wartość ich kąta zwilżania nie przekroczyła 90° . Jednakże, próbki piaskowane charakteryzowały się wyższą zwilżalnością w porównaniu do mechanicznie polerowanych próbek kontrolnych. Prócz stwierdzenia większej hydrofilowości w wyniku obróbki piaskowaniem, na podstawie otrzymanych wyników nie można określić żadnej relacji między rozmiarem cząstek użytego ścierniwa a wartością kąta zwilżania. Warto jednak zaznaczyć, że w większości badanych kompletów (z wyłączeniem serii s. 45), zwilżalność próbek zależała od rodzaju użytego biomateriału i osiągnęła mniejsze wartości kąta w przypadku próbek ze stopu Ti-6Al-7Nb.

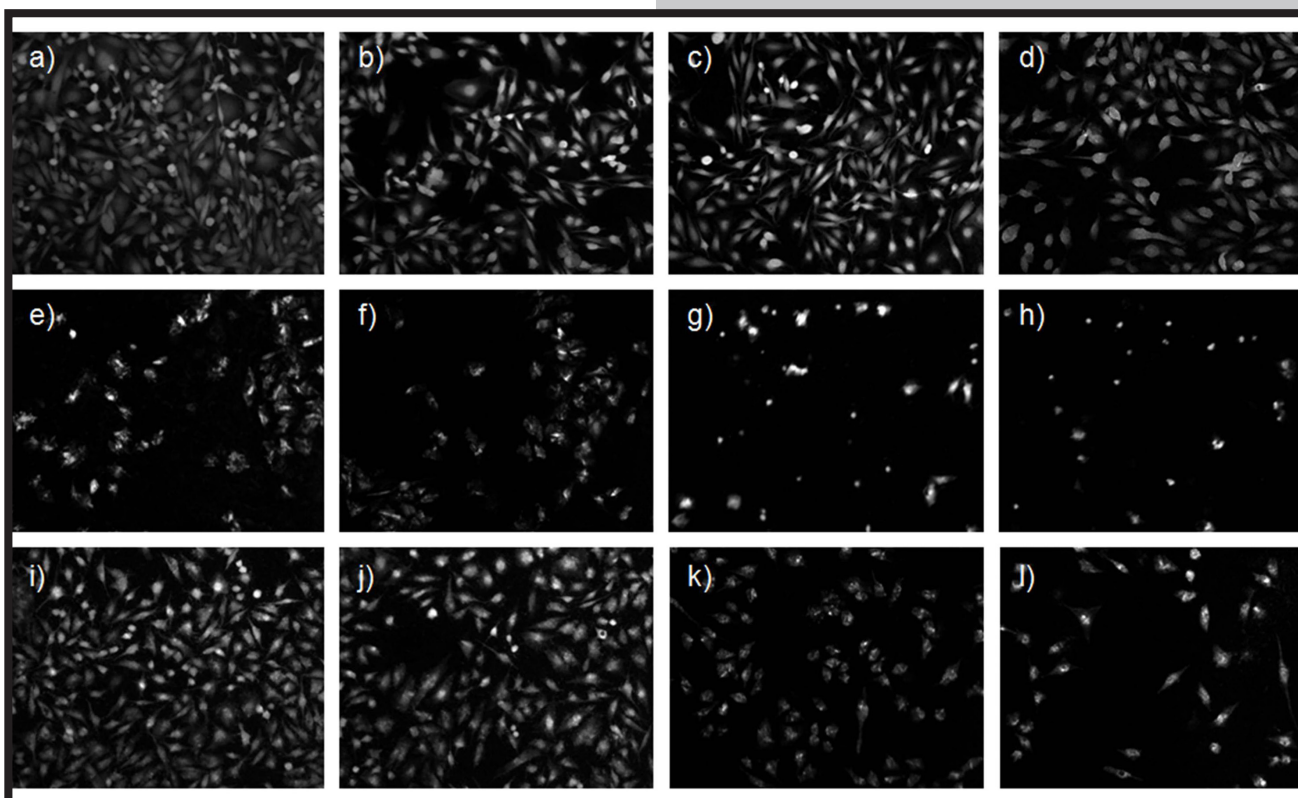
Ostatnim z etapów badania właściwości przygotowanych powierzchni było określenie zachowania ludzkich komórek osteoblastopodobnych hodowanych z nimi w bezpośrednim kontakcie. Jakościową ocenę gęstości zasiedlenia i rozmieszczenia komórek na powierzchni badanych materiałów przedstawiają zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego na RYS. 5.



RYS. 4. Zwilżalność przygotowanych powierzchni.
FIG. 4. Water contact angle of the prepared surfaces.

The next surface property to be analysed was surface wettability. Sessile drop measurements revealed that all of the prepared surfaces were hydrophilic since water contact angle did not exceed 90° (FIG. 4). Moreover, the sandblasted samples were characterized by lower water contact angles than the mechanically polished reference samples. Even though no clear relation between size of the blasting medium particles and surface wettability was observed, one could note that in general (apart from s. 45 series), wettability of the niobium-containing alloy was higher than for the vanadium-containing counterpart.

In the final step, the behaviour of the osteoblast-like cells cultured in contact with the prepared surfaces was evaluated. FIG. 5 presents the fluorescence microscopic images showing density and distribution of the cells over the prepared surfaces. The control samples were characterized by high proliferation rate and evenly distributed cells of proper, spindle-like shape. Contrary to the aforementioned, the samples treated with big blasting particles of about 200 and 115 µm in diameter resulted not only in very low proliferation rate but also in different, abnormal shape of the cells.



RYS. 5. Ocena zachowania komórek osteoblastopodobnych po 48 godzinach hodowli: bez kontaktu z biomateriałem (a), stal austenityczna 316L (b), Ti+V/mp (c), Ti+Nb/mp (d), Ti+V/s.200 (e), Ti+Nb/s.200 (f), Ti+V/s.115 (g), Ti+Nb/s.115 (h), Ti+V/s.60 (i), Ti+Nb/s.60 (j), Ti+V/s.45 (k), Ti+Nb/s.45 (l).

FIG. 5. Osteoblasts-like cells' response after 48 hour of culture: Saos-2 control (a), 316L mechanically polished (b), Ti+V/mp (c), Ti+Nb/mp (d), Ti+V/s.200 (e), Ti+Nb/s.200 (f), Ti+V/s.115 (g), Ti+Nb/s.115 (h), Ti+V/s.60 (i), Ti+Nb/s.60 (j), Ti+V/s.45 (k), Ti+Nb/s.45 (l).

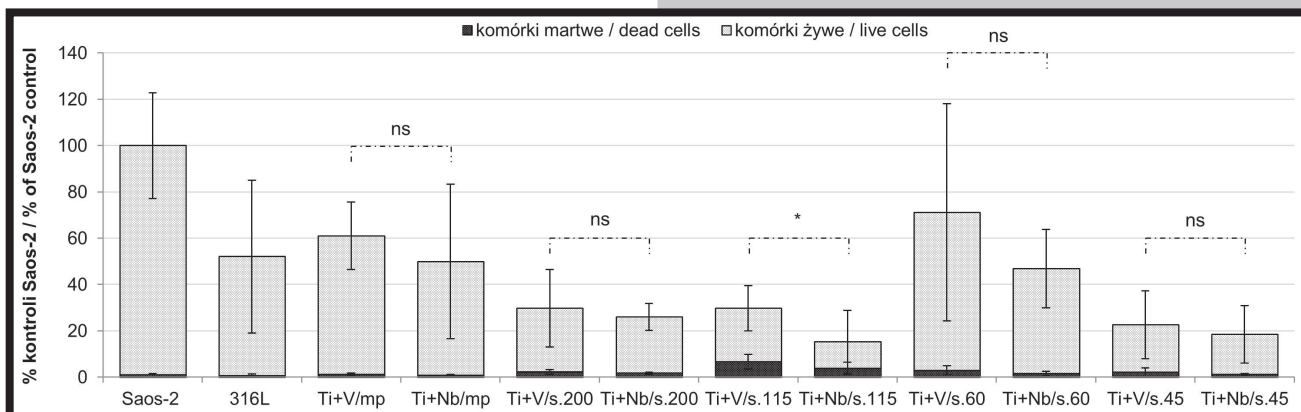
Komórki osiadłe na próbkach kontrolnych miały prawidłowy, wrzecionowaty kształt i zasiedlały powierzchnię w dużych ilościach, w sposób równomierny. Takich wyników nie osiągnięto w przypadku próbek piaskowanych dużymi cząstkami materiału ściernego. Na powierzchniach traktowanych cząstkami o wielkości około 200 i 115 μm zaobserwować można małą liczbę komórek, wszystkie o nienaturalnym kształcie. Podobne rezultaty uzyskano dla próbek piaskowanych najmniejszymi ziarnami piasku ($\sim 45 \mu\text{m}$), choć w tym przypadku komórki były mniej zdeformowane. Spośród przebadanych zestawów próbek piaskowanych najlepsze wyniki osiągnięto dla powierzchni modyfikowanych stosunkowo małymi cząstkami, których rozmiar wynosił około 60 μm średnicy. Przewaga kompletu s.60 była widoczna nie tylko w stopniu proliferacji i równomierności rozmieszczenia komórek na powierzchni próbki, ale także w ich kształcie, który był najbardziej zbliżony do zaobserwowanego w przypadku prób kontrolnych.

Ilościową ocenę barwienia live/dead pokazano na RYS. 6. Wykres przedstawia różnice w stopniu proliferacji komórek (wysokość każdej kolumny) oraz cytotoksyczność badanych powierzchni (odsetek martwych komórek). Otrzymane dane wskazują, że żaden z przebadanych kompletów nie osiągnął lepszych rezultatów od próbki kontrolnej, gdzie komórki nie były wystawione na kontakt z żadnym biomateriałem metalicznym. Próbki poddane piaskowaniu wykazały większą cytotoksyczność aniżeli próbki polerowane mechanicznie. Analiza wariancji ANOVA ujawniła różnice statystycznie dla stopnia proliferacji komórek na obu stopach w przypadku porównania próbek serii s.60 i s.115, a także serii s.45 w odniesieniu do próbek kontrolnych polerowanych mechanicznie oraz serii s.60.

Similar results, but with better cell shape, were obtained for the samples blasted with the smallest particles ($\sim 45 \mu\text{m}$). Among the sandblasted surfaces, the best biological response was obtained for the samples treated with relatively small blasting particles of about 60 μm in diameter. For the s.60 series high proliferation rate and proper cell morphology, similar to that obtained in the case of the control samples were observed.

The quantitative results of the live/dead test are given in FIG. 6. The graph outlines differences in cell proliferation rate (height of each particular bar) and surface cytotoxicity (ratio of dead cells). All examined samples were characterized by lower proliferation rate than the control sample which was not exposed to contact with any biomaterial. Additionally, higher surface cytotoxicity level was noted for all of the sandblasted surfaces in comparison to the mechanically polished samples. The ANOVA analysis of variance showed statistical significance in proliferation level difference for both alloys while comparing s.60 and s.115 series, as well as for series s.45 compared to mechanically polished control samples and series s.60.

The described analysis served also as the examination of the influence of applied biomaterial type on the biological response of the cells cultured on Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb specimens. The statistical analysis revealed that there were significant differences in proliferation level for samples sandblasted with particles of $\sim 115 \mu\text{m}$ according to the used material. The relation was marked in the graph in FIG. 6.



RYS. 6. Ocena stopnia proliferacji komórek oraz cytotoksyczności badanych powierzchni (ns - brak różnic statystycznie, * - różnice statystycznie).

FIG. 6. Cell proliferation and biomaterial surface cytotoxicity assessment (ns - no statistical significance, * - statistical significance).

W przeprowadzonym badaniu przeanalizowano także wpływ zastosowanego rodzaju biomateriału na odpowiedź biologiczną komórek hodowanych na powierzchniach Ti-6Al-4V oraz Ti-6Al-7Nb. Analiza statystyczna dowiodła, że dla próbek traktowanych piaskiem o średnicy ok. 115 μm , otrzymane różnice w stopniu proliferacji komórek były znikome, co oznaczono na wykresie na RYS. 6.

Przeprowadzone badania pozwalają zauważyć, że piaskowanie biomateriałów wpływa na ich właściwości, co jest odzwierciedlane w zachowaniu komórek będących z nimi w kontakcie. W wielu opublikowanych do tej pory artykułach opisano zalecenia co do wielkości cząstek, którymi powinno się piaskować materiały do zastosowań biomedycznych. Niektóre ze źródeł mówią o stosunkowo małym zakresie 25-75 μm średnicy [12]. Głównym celem dostosowywania cząstek piaskujących jest znalezienie ich optymalnych rozmiarów. Oczekuje się, by były one wystarczająco duże aby zwiększyć chropowatość i rozwinięcie powierzchni potrzebne dla dobrego kontaktu na granicy implantu i kości, a jednocześnie na tyle małe, by nie stanowiły ryzyka uwolnienia pozostałości poprocesowych do organizmu. Mimo że opisane w tej pracy badania wykazały zależność pomiędzy rozmiarem cząstek ścierniwa a chropowatością i składem chemicznym obrabianej powierzchni, otrzymane wyniki nie stanowią podstawy do określenia relacji pomiędzy rozmiarem cząstek a zwilżalnością powierzchni i odpowiedzią biologiczną komórek hodowanych z nimi w kontakcie. Można stwierdzić, że piaskowanie podwyższyło cytotoksyczność powierzchni, o czym świadczy mniejsza śmiertelność komórek na powierzchniach polerowanych mechanicznie. Mając na uwadze, że piaskowane biomateriały na bazie tytanu i jego stopów są uważane za dobre podłoża dla osadzania się i proliferacji komórek osteoblastów [13,14], przyjęto, że przyczyną niewielkiej odpowiedzi biologicznej w stosunku do otrzymanych powierzchni jest sposób ich przygotowania. Nawet czyszczenie próbek kolejno w acetonie, alkoholu i wodzie przy pomocy myjki ultradźwiękowej nie było zabiegiem wystarczającym do usunięcia cząstek ścierniwa, które wbudowały się w materiał podczas piaskowania, a później zostały uwolnione do medium hodowlanego. W pracach innych autorów wskazywano, że przenikanie glinu z powierzchni piaskowanych cząstkami tlenku glinu może być przyczyną słabej proliferacji komórek osteoblastopodobnych na takich elementach [11]. Potwierdzeniem założenia, że w przypadku badanych w tej pracy materiałów również doszło do odkładania się pozostałości poprocesowych są wskazania składu pierwiastkowego badanych powierzchni, uwzględnione w kontekście rodzaju użytych cząstek piaskujących.

By and large, the conducted study proved that sandblasting of biomaterials leads to a difference in their properties that can be observed while evaluating the behaviour of cells adhered to the given surfaces. Many other papers published so far indicate particular size spectra of the blasting medium, where some of them advise application of particles falling into relatively narrow 25-75 μm range [12]. The main objective of the adjustment of abrasive particles size is finding beads big enough to produce roughness that would be suitable for implant and tissue interlocking, but at the same time, substantially small so the surface would not release toxic ions to the external environment. Even though there was a clear dependency between the blasting particles size and the resulting roughness and chemical composition, no such relationship was observed for neither surface wettability nor biological response. It can be stated that sandblasting resulted in elevated surface cytotoxicity compared to mechanical polishing. Owing to the fact that rough sandblasted surfaces of titanium-based biomaterials are considered to be suitable for osteoblasts that are likely to settle and proliferate onto such surfaces [13,14], it was assumed that the particular process of sandblasting conducted in the study could be a reason for poor biological response of the cells towards the prepared surfaces. Even after ultrasonic cleaning in acetone, alcohol and water, the surfaces still possessed residues of the blasting medium embedded into the bulk material, which penetrated into the cell culture medium. It was already noticed that aluminium releases from the sandblasted surfaces may be a reason for poor osteoblast-like cells [11]. The assumption of occurrence of processing residues in the examined samples is in agreement with the results of EDS analysis which revealed the presence of the Si, Na, O and Al residues, showing that the applied blasting medium contained not only Al_2O_3 particles. Apart from the aforementioned, some additional amounts of Na_2O and SiO_2 are present as well. Despite the lack of clear correlation between the size of the blasting medium and surface wettability, it is expected that change in the biomaterial chemical composition is also a reason for alternations in its wettability. In order to reduce occurrence of the processing residues that influence properties of the manufactured elements, the step of finishing of sandblasted surfaces may be enriched by additional treatment methods. It was shown that sandblasted surfaces, apart from standard cleaning procedures, may be also subjected to electropolishing [15].

Zgodnie z kartą charakterystyki, używane ścierniwo składało się głównie z Al_2O_3 , niemniej obecne są również domieszki Na_2O i SiO_2 , co tłumaczy podwyższoną zawartość tlenu i glinu, a także dodatkową obecność sodu i krzemu na badanych powierzchniach. Chociaż nie zauważono jasnej zależności między wielkością zastosowanych cząstek a zwilżalnością obrabianej powierzchni, przypuszcza się, że ulegająca zmianie hydrofilowość ma swoje podłoże w różnym składzie chemicznym wynikającym z wbudowywania się cząstek ścierniwa w biomateriał. W celu zredukowania pozostałości po procesowych zmieniających właściwości gotowego elementu, etap wykańczania powierzchni piaskowanych biomateriałów można wydłużyć, dodając kolejne metody obróbki powierzchni. Jak sugerują prace innych autorów, prócz standardowych procesów czyszczenia, próbki po piaskowaniu można poddawać dodatkowym zabiegom obróbki elektrochemicznej [15].

Zgodnie z wynikami przeprowadzonych badań, najlepszą odpowiedzią biologiczną odznaczyły się próbki piaskowane ścierniwem o wielkości cząstek w zakresie 53-75 μm (seria s.60). W pozostałych przypadkach komórki zasiedlały mniejszą powierzchnię i to w sposób nierównomierny, przybierając nieregularne kształty. Analiza właściwości biologicznych próbek piaskowanych medium o różnej wielkości ziarna nie przyniosła jasnych zależności. Porównując stopień proliferacji komórek dla obu użytych stopów, zauważyć można trend, gdzie powierzchnie zawierające wanad zasiedlane były przez większą liczbę komórek w porównaniu do ich bezwanadowych odpowiedników. Pomimo stosunkowo wysokich odchyleń standardowych dla przebadanych przypadków, analiza wariancji ANOVA potwierdziła tę zależność dla serii próbek s.115. Jest to o tyle interesujące, że obecnie, aby uniknąć potencjalnego uwolnienia wanadu do organizmu, stopy Ti-6Al-4V zastępuje się materiałami niezawierającymi tego pierwiastka, między innymi stopem Ti-6Al-7Nb.

Wnioski

W niniejszej pracy dążono do określenia różnic wynikających z piaskowania biomateriałów na bazie tytanu ścierniwem o różnej wielkości cząstek. Przeprowadzone badania dowiodły, że rozmiar ziaren medium piaskującego ma wpływ na chropowatość, zwilżalność oraz na skład chemiczny modyfikowanych elementów, a także prowadzi do zmiennej odpowiedzi biologicznej komórek stykających się z takimi powierzchniami. Wykazano, że chropowatość powierzchni jest skorelowana z rozmiarem cząstek ścierniwa i większa się wraz ze wzrostem ich średnicy, powodując jednoczesną zmianę składu chemicznego obrabianej powierzchni. Mimo to, nie sposób określić prostej zależności między warunkami piaskowania a zachowaniem komórek osteoblastopodobnych hodowanych w kontakcie z przygotowanymi powierzchniami. Ocena właściwości biologicznych piaskowanych powierzchni wykazała, że najwyższą proliferacją komórek spośród próbek modyfikowanych tą metodą charakteryzowały się powierzchnie traktowane cząstkami tlenu glinu o wielkości 53-75 μm . Niższą proliferację, w porównaniu do kontroli, zaobserwowano w przypadku wszystkich próbek poddawanych piaskowaniu. Ponadto, powierzchnie piaskowane wykazały wysoką cytotoksyczność. Efekt ten można przypisać wbudowywaniu się cząstek ścierniwa w powierzchnię materiału, a następnie ich uwalnianiu do medium komórkowego podczas hodowli.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować dr Witoldowi Szymańskiemu, który umożliwił przeprowadzenie procesu piaskowania badanych w pracy elementów.

As shown in the results, the best biological response towards the sandblasted surfaces was obtained for samples treated with abrasive medium which size fell in range of 53-75 μm (series s.60). For the rest of the cases, the number of cells that adhered to the surface was smaller and the cells took abnormal shape. The analysis resulted in no straightforward relationship between the size of the sandblasting particles and the resulting osteoblast-like cells' behaviour. By comparing the proliferation level for both titanium alloys used, one can notice a tendency that the niobium-containing alloy evoked worse cell proliferation than its vanadium-containing counterpart. Despite relatively high standard deviations for the particular cases, The ANOVA analysis of variance outlined statistical significance in differences between the materials subjected to sandblasting in series s.115. This phenomenon was particularly interesting regarding to the current trend to exchange implants made of Ti-6Al-4V with Ti-6Al-7Nb-based devices in order to avoid a release of toxic vanadium to the human organism.

Conclusions

The following study aimed to investigate differences resulting from the application of different size of abrasive particles during sandblasting of the titanium-based biomaterials. The conducted tests proved that the varying size of the blasting beads influences roughness, wettability and chemical composition of the sandblasted elements and it stands for changes in biological response of the osteoblast-like cells cultured on the modified surfaces. The surface roughness was inseparably related to the size of the blasting particles and it increased substantially with the increasing size of particle diameter, simultaneously changing surface chemical composition. On the other hand, there was no straightforward correlation between size of the applied particles and biological response towards the examined surfaces. The analysis revealed that the best cell proliferation level was obtained within samples sandblasted by 53-75 μm alumina particles. All the sandblasted specimens evoked lower cell proliferation than the control samples. Application of sandblasting resulted in high surface cytotoxicity which is expected to come from blasting particles becoming embedded into the materials and later released to the cell culture medium.

Acknowledgments

The authors would like to thank Witold Szymański, PhD who made sandblasting of the study specimens possible.

Pismiennictwo

- [1] Elias C.N., Lima J.H.C., Valiev R., Meyers M.A.: Biomedical Applications of Titanium and its Alloys. The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society 60 (3) (2008) 46.
- [2] Alla R.L., Ginjupalli K., Upadhy N., Shammam M., Ravi R.K., Sekhar R.: Surface Roughness of Implants: A Review. Trends in Biomaterials & Artificial Organs 25(3) (2011) 112-118.
- [3] Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H.: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. Journal Of Biomedical Materials Research 25 (1991) 889-902.
- [4] Anselme K., Biggerelle M.: Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. Acta Biomaterialia 1 (2005) 211-222.
- [5] Gotfredsen K., Berglund T., Lindhe J.: Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. Clinical Implant Dentistry and Related Research 2 (2000) 120-128.
- [6] Klokkevold P., Nishimura R.D., Adachi M., Caputo A.: Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. A torque removal study in the rabbit. Clinical Oral Implants Research 8 (1998) 442-447.
- [7] Guehenne L., Lopez-Heredia M.A., Enkel B., Weiss P., Amouriq Y., Layrolle P.: Osteoblastic cell behaviour on different titanium implant surfaces. Acta Biomaterialia 4 (2008) 535-543.
- [8] Bächle M., Kohal R. J.: A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. Clinical Oral Implants Research 15 (2004) 683-692.

References

- [9] Brunette D. M.: Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses, and Medical Applications. Springer Science & Business Media, 2001.
- [10] Oshida Y.: Surface Engineering and Technology for Biomedical Implants. Momentum Press, 2014.
- [11] Anselme K., Linez P., Biggerelle M., Le Maguer D., Le Maguer A., Hardouin P., Hildebrand H.F., Lost A., Leroy J.M.: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. Biomaterials 21 (2000) 1567-1577.
- [12] Łukaszewska M., Gajdus P., Hędzalek W., Zagalak R.: Development of titanium implants surface. Review. Implantoprotetyka 10 3(36) (2009) 24-29.
- [13] Schuler M., Owen G.R., Hamilton D.W., de Wild M., Textor M., Brunette D.M., Tosatti S.G.: Biomimetic modification of titanium dental implant model surfaces using the RGDSP-peptide sequence: a cell morphology study. Biomaterials 27 (2006) 4003-4015.
- [14] Germanier Y., Tosatti S., Brogini N., Textor M., Buser D.: Enhanced bone apposition around biofunctionalized sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces. Clinical Oral Implants Research 17 (2006) 251-257.
- [15] Wang J.H., Surface preparation techniques for biomedical applications. W: Driver M., Coatings for Biomedical Applications. Woodhead Publishing Limited (2012) 143-175.

BADANIE PROCESU RELAKSACJI NAPRĘŻEŃ SKÓRY ŚWIŃSKIEJ

ANETA LIBER-KNEĆ*, SYLWIA ŁAGAN

ZAKŁAD MECHANIKI DOŚWIADCZALNEJ I BIOMECHANIKI,
INSTYTUT MECHANIKI STOSOWANEJ,
POLITECHNIKA KRAKOWSKA
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW
*E-MAIL: ALIBER@PK.EDU.PL

Streszczenie

Właściwości mechaniczne tkanki skórnej są heterogeniczne, anizotropowe, nieliniowe i lepkosprężyste ze względu na jej niejednorodność oraz kompleksowość struktur. W artykule opisano badania relaksacji naprężeń świeżej tkanki skóry świńskiej dla różnych poziomów odkształcenia (5%, 10% i 15%). Próbkki zostały pobrane z grzbietu zwierzęcia, równolegle oraz prostopadłe w stosunku do jego długiej osi ciała. Statyczna próba rozciągania została przeprowadzona w celu scharakteryzowania parametrów mechanicznych skóry: moduł Younga dla równoległych/prostopadłych próbek wyniósł $11,5 \pm 2,5/19,0 \pm 2,1$ MPa, wytrzymałość na rozciąganie $11,4 \pm 1,4/13,0 \pm 1,7$ MPa, odkształcenie przy zniszczeniu $21,3 \pm 1,1/34,4 \pm 4,7$ mm. Różne kierunki pobrania próbek wpłynęły na właściwości lepkosprężyste. Dla próbek prostopadłych zostały osiągnięte następujące poziomy naprężenia początkowe: dla 5% odkształcenia około 0,3 MPa w 30 s, dla 10% odkształcenia około 1,1 MPa w 60 s i dla 15% odkształcenia 2,3 MPa w 90 s. Naprężenie początkowe osiągnięte dla próbek równoległych dla 5% odkształcenia wyniosło 0,3 MPa w 30 s, dla 10% odkształcenia 0,4 MPa w 60 s, i dla 15% odkształcenia osiągnęło wartość 1 MPa w 90 s. Krzywe relaksacji miały różny zakres czasu relaksacji dla różnych poziomów odkształcenia. Czas relaksacji dla równoległych/prostopadłych próbek dla różnych poziomów odkształcenia wyniósł: 5% - 90/100 s, 10% - 110/150 s, 15% - 1000/1600 s. Do matematycznego modelowania mechanicznych właściwości tkanki skórnej świni wykorzystano model QLV.

Słowa kluczowe: skóra, lepkosprężystość, relaksacja naprężeń, właściwości mechaniczne

[Inżynieria Biomateriałów 134 (2016) 18-24]

Wprowadzenie

Ludzka skóra stanowi kompleksową tkankę składającą się z kilku heterogenicznych warstw, naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej. Każda warstwa posiada unikalną strukturę i funkcję [1-3]. Naskórek składa się z komórek i resztek komórkowych, skóra właściwa w większości z sieci włókien kolagenowych, retikuliny i elastyny, a tkanka podskórna przede wszystkim składa się z tkanki łącznej i płatków tłuszczu [4]. Skóra poddana działaniu naprężenia zachowuje się jak niehomogeniczny, anizotropowy, nieliniowy i lepkosprężysty materiał [2,4]. Typowy wykres naprężenie-odkształcenie dla skóry prezentuje właściwości nieliniowe i składa się z trzech faz. W początkowym etapie obciążenia, włókna kolagenowe są splecione w wzór rombu, a duże deformacje skóry pojawiają się przy relatywnie małym obciążeniu. W tej fazie włókna elastyny (które utrzymują skórę gładką) są głównie odpowiedzialne za mechanizm rozciągania.

TESTING STRESS RELAXATION PROCESS OF A PORCINE SKIN

ANETA LIBER-KNEĆ*, SYLWIA ŁAGAN

DIVISION OF EXPERIMENTAL MECHANICS AND BIOMECHANICS,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
AL. JANA PAWŁA II 37, 31-864 KRAKÓW, POLAND
*E-MAIL: ALIBER@PK.EDU.PL

Abstract

Mechanical behavior of skin tissue is described as heterogeneous, anisotropic, nonlinear and viscoelastic because of its nonhomogeneous, complex structure. This paper reports the study stress relaxation behavior of fresh porcine tissue skin for different strain levels (5%, 10% and 15%). The samples were taken parallel and perpendicular to the long axis of the pig's body, from dorsal area. The tensile test of skin samples was carried out to characterize mechanical parameters of skin material: Young's modulus for parallel/perpendicular samples was $11.5 \pm 2.5/19.0 \pm 2.1$ MPa, tensile strength was $11.4 \pm 1.4/13.0 \pm 1.7$ MPa, elongation at break was $21.3 \pm 1.1/34.4 \pm 4.7$ mm. The different directions of sampling influenced the viscoelastic properties. The perpendicular samples achieved the following levels of initial stress: at 5% strain of about 0.3 MPa in 30 s, at 10% strain of about 1.1 MPa in 60 s and at 15% strain 2.3 MPa in 90 s. The initial stress reached by the parallel sample for 5% strain was 0.3 MPa in 30 s, at 10% strain was 0.4 MPa in 60 s, and for 15% strain reached a value of 1 MPa in 90 s. Relaxation curves had different time ranges of stress relaxation for different levels of strain. The time of relaxation for parallel/perpendicular samples for different strain levels was: 5% - 90/100 s, 10% - 110/150 s, 15% - 1000/1600 s. The QLV theory was used to the mathematical modeling mechanical behavior of porcine skin tissue.

Keywords: skin, viscoelasticity, stress relaxation, mechanical properties

[Engineering of Biomaterials 134 (2016) 18-24]

Introduction

The human skin is a complex tissue which consists of several heterogeneous layers: the epidermis, the dermis, and the hypodermis. Each layer has a unique structure and function [1-3]. The epidermis consists of cells and cellular debris; the dermis consists mostly of protein networks of collagen, reticulin and elastin fibers; and the hypodermis is primarily made up of connective tissue and fat lobules [4]. The skin subjected to stress behaves like a non-homogeneous, anisotropic, and non-linear viscoelastic material [2,4]. A typical stress-strain graph for the skin presents non-linear characteristics. It comprises three phases. In the initial loading phase, the collagen fibers are woven into a rhombic-shaped pattern. High deformations of the skin occur at a relatively low applied load. In this phase, the elastin fibers (which keep the skin smooth) are mainly responsible for the stretching mechanism.

Zależność naprężenie-odkształcenie jest w przybliżeniu liniowa, a moduł sprężystości skóry w tej fazie jest niski. W drugiej fazie rozciągania sztywność skóry wzrasta stopniowo, a włókna kolagenowe ulegają prostowaniu w kierunku przyłożonego obciążenia. Przy wysokim naprężeniu rozciągającym pofałdowany wzór zanika, a włókna kolagenowe ulegają wyprostowaniu. Są one przede wszystkim wyprostowane względem siebie i w kierunku pojawiającego się obciążenia. Wyprostowane włókna kolagenowe są odporne na wyższe obciążenia i tkanka staje się sztywna przy wyższych naprężeniach. Zależność naprężenie-odkształcenie ponownie staje się liniowa. W następującej trzeciej fazie wytrzymałość na rozciąganie zostaje osiągnięta i włókna zaczynają pękać [4-6]. Jak pokazuje przegląd literatury właściwości biomechaniczne skóry były badane zarówno w testach *in vivo*, jak i *in vitro* [2-4]. W literaturze, wartość modułu Younga dla skóry świnińskiej waha się od 7 do 62 MPa [7,8], wytrzymałości na rozciąganie od 2,5 do 16 MPa [7,9], a odkształcenie przy zerwaniu od 30 do 100% [7,8].

Właściwości lepkosprężyste tkanki skórnej ujawniają się poprzez wprowadzenie stałej wartości naprężenia, które wywołuje określony poziom odkształcenia tkanki. Odształcenie jest utrzymywane na stałym poziomie przez określony czas, w trakcie którego mierzona jest wartość naprężenia w tkance. Naprężenie początkowe wywołane w tkance zmniejsza się w czasie (relaksacja naprężenia). Inną lepkosprężystą właściwością jest pełzanie, które bada się wprowadzając stałą wartość naprężenia i mierząc wzrost wydłużenia tkanki w czasie [10-12]. Jedną z metod opisu relaksacji naprężeń tkanek miękkich jest quasi-liniowy lepkosprężysty (QLV) konstytutywny model, po raz pierwszy wykorzystany przez Funga [13]. Model QLV stanowi adaptację liniowego modelu lepkosprężystego, który jest odpowiedni dla nieliniowych materiałów, takich jak tkanka skórna [12].

Skóra świnińska jest stosowana jako zamiennik skóry ludzkiej w wielu badaniach naukowych [14]. W artykule opisano badania relaksacji naprężenia skóry świnińskiej z uwzględnieniem kierunku pobrania próbek, dla trzech poziomów odkształcenia oraz adaptację danych doświadczalnych przy użyciu modelu quasi-liniowo lepkosprężystego.

Materiały i metody

Próbki świeżej skóry świnińskiej zostały pobrane z grzbietu świni w dwóch kierunkach w stosunku do długiej osi ciała zwierzęcia: równoległym i prostopadłym. Wszystkie próbki miały te same wymiary: długość 100 mm i szerokość 10 mm. Średnia grubość wyniosła $2,2 \pm 0,2$ mm. Właściwości mechaniczne przy obciążeniu statycznym (moduł sprężystości, wytrzymałość na rozciąganie) oraz testy relaksacji, zostały przeprowadzone przy użyciu maszyny wytrzymałościowej MTS Insight 50. Próbki były montowane w uchwytach maszyny i rozciągane z prędkością 5 mm/min w temperaturze pokojowej (5 próbek z każdego kierunku). Baza pomiarowa próbek wyniosła 50 mm. W testach relaksacji każda próbka (3 dla każdego testu) była obciążana wstępnie siłą 2 N, a potem obciążana, do osiągnięcia różnych poziomów odkształceń (5%, 10%, 15%) w celu badania efektów relaksacji naprężenia w czasie. W celu dopasowania danych naprężenie-czas uzyskanych w procesie relaksacji wykorzystano model QLV [12].

Model konstytutywny QLV oraz funkcja naprężenia znormalizowanego zostały również przeanalizowane. Funkcja naprężenia znormalizowanego opisywana jest jako:

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\sigma_{\max}} \quad (1)$$

$$G(0) = 1 \quad (2)$$

gdzie $\sigma(t)$ to naprężenie w czasie t , $\sigma_{\max}$ to naprężenie początkowe, amplituda przy $t = t_p$ odpowiadająca maksymalnemu naprężeniu.

The stress-strain relation is approximately linear and the elastic modulus of the skin in this phase is low. In the second phase of stretching, the stiffness of the skin gradually increases as the collagen fibers align themselves in the direction of the applied load. At a high tensile stress, the crimp pattern disappears and the collagen fibers become straighter. They are primarily aligned one in respect to another and in the direction in which the load is applied. The straightened collagen fibers withstand higher loads and the tissue becomes stiff at higher stresses. The stress-strain relation becomes linear again. In the third phase, the ultimate tensile strength is reached and the fibers begin to break [4-6]. The literature review shows that the biomechanical properties of skin have been measured by both *in vivo* and *in vitro* tests [2-4]. In the literature, the Young's modulus of the porcine skin fluctuates between 7 and 62 MPa [7,8], tensile strength between 2.5 and 16 MPa [7,9], elongation at break between 30 and 100% [7,8].

The viscoelastic behavior of skin tissue can be demonstrated by the application of a fixed amount of tension that results in a certain degree of tissue elongation, which is held constant for a certain period of time, after which, the tension within the tissue is measured. The initial stress generated decreases with time (stress relaxation). Another viscoelastic property of skin is creep, demonstrated by the application of a fixed stress, while the initial extension in the tissue increases with time [10-12]. One of the methods to characterize stress relaxation behavior of soft tissue is quasi-linear viscoelastic (QLV) constitutive model, first used by Fung [13]. The QLV model is an adaptation of linear viscoelasticity model that is appropriate for nonlinear materials, such as skin tissue [12].

The porcine skin is a well-established replacement for human skin in many scientific studies [14]. This study investigates the stress relaxation of porcine skin tissue in the respect to the specimens taken direction for three strain levels and adaptation of the experimental data using quasi-linear viscoelastic model.

Materials and Methods

The samples of fresh skin were taken from the dorsal region of a pig in two directions with respect to the long axis of the animal body: parallel and perpendicular. All samples had the same dimensions: the length 100 mm and the width 10 mm. The average thickness was equal to 2.2 ± 0.2 mm. The mechanical properties under static tension (modulus of elasticity, tensile strength) and relaxation tests were determined with the use of the MTS Insight 50 testing machine. The samples were mounted using the flat clamps and they were extended at the speed of 5 mm/min under ambient temperature (5 samples for the each direction). The measurement base of the sample was 50 mm. With stress relaxation tests, each sample (3 for every test) was preloaded with 2 N and then loaded to different strains (5%, 10%, 15%) to observe its effects on stress relaxing over time. The QLV model was used to fit the stress-time data during the relaxation process [12].

The QLV constitutive model and the normalized stress function were investigated in this study also. The normalized stress function is described as:

$$G(t) = \frac{\sigma(t)}{\sigma_{\max}} \quad (1)$$

$$G(0) = 1 \quad (2)$$

where $\sigma(t)$ is the stress at time t , $\sigma_{\max}$ is the initial stress, amplitude at $t = t_p$ corresponding to the maximum stress.

Chwilowe napężenie jest zdefiniowane następującym równaniem:

$$\sigma(t) = G(t) \cdot \sigma^e(\varepsilon) \quad (3)$$

gdzie $\sigma^e(\varepsilon)$ jest to napężenie sprężyste natychmiastowe.

Czasowa zależność właściwości mechanicznych tkanek miękkich jest opisywana równaniem:

$$\sigma(t) = \int_0^t G(t-\tau) \frac{\partial \sigma^e(t)}{\partial \varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial \tau} \quad (4)$$

gdzie $\frac{\partial \sigma^e(t)}{\partial \varepsilon}$ jest to zmiana natychmiastowego napężenia sprężystego zależna od odkształceń sprężystych, i $\frac{\partial \varepsilon}{\partial t}$ to czasowo zależne odkształcenie próbki. Zredukowana funkcja relaksacji jest zapisywana następująco:

$$G(t) = ae^{-bt} + ce^{-dt} + ge^{-ht} \quad (5)$$

gdzie a, b, c, d, g, h są stałymi, które mogą być obliczone z danych eksperymentalnych. Funkcja eksponentialna zależności napężenia od odkształcenia, która jest wykorzystywana często do opisu charakterystyki nieliniowej sprężystości tkanek skóry, jest zapisywana następująco:

$$\sigma^e(\varepsilon) = A(e^{B\varepsilon} - 1) \quad (6)$$

gdzie A jest liniowym parametrem, które ma ten sam wymiar jak napężenie, a B to bezwymiarowy współczynnik opisujący nieliniową odpowiedź sprężystą.

Procedura optymalizacji została przeprowadzona przy użyciu OriginLab w celu wygenerowania danych dopasowania do krzywej relaksacji dla tkanki skórnej.

Wyniki i dyskusja

Wstępne testy jednoosiowego rozciągania zostały przeprowadzone w celu charakterystyki podstawowych właściwości (modułu sprężystości, wytrzymałości na rozciąganie) próbek skóry (TABELA 1). Zarejestrowane krzywe rozciągania badanych próbek zawierały trzy charakterystyczne dla tkanki skórnej obszary, omówione we wprowadzeniu niniejszej pracy (RYS. 1). W pierwszej fazie, trwającej do ok. 25% odkształcenia, można zaobserwować duże odkształcenie przy relatywnie niskim poziomie napężenia. Charakterystyka napężeniowo-odkształceniowa jest w tym etapie w przybliżeniu liniowa. W drugiej fazie rozciągania, (25-60% odkształcenia) następuje wzrost sztywności materiału, występuje w tym zakresie kolejny obszar liniowy krzywej rozciągania. W trzecim etapie, gdy wytrzymałość zostaje przekroczona, próbka ulega zniszczeniu. Porównując otrzymane wyniki badań z danymi literaturowymi widać różnice w wartościach oznaczonych parametrów. Wynika to z biologicznej różnorodności pomiędzy osobnikami, wrażliwości tkanek biologicznych na warunki testów i przechowywania próbek, problemów z pobraniem próbek o jednakowych wymiarach (np. różna grubość), jak również z anizotropowego charakteru skóry [15].

Testy relaksacji pokazały, że szybka relaksacja występuje natychmiast po wywołaniu odkształcenia, następnie relaksacja jest umiarkowana i w końcu występuje wolna relaksacja w czasie, która jest zależna od poziomu odkształcenia oraz kierunku pobrania próbek.

The temporary stress is defined by the following equation:

$$\sigma(t) = G(t) \cdot \sigma^e(\varepsilon) \quad (3)$$

where $\sigma^e(\varepsilon)$ is the stress temporary strain.

The time-dependent mechanical behavior of soft tissues is defined as:

$$\sigma(t) = \int_0^t G(t-\tau) \frac{\partial \sigma^e(t)}{\partial \varepsilon} \frac{\partial \varepsilon}{\partial \tau} \quad (4)$$

where $\frac{\partial \sigma^e(t)}{\partial \varepsilon}$ is the temporary elastic response, and $\frac{\partial \varepsilon}{\partial t}$ is the time-dependent strain of the sample. The reduced relaxation function is given as:

$$G(t) = ae^{-bt} + ce^{-dt} + ge^{-ht} \quad (5)$$

where a, b, c, d, g, h are constants, which could be determined from experimental data. An exponential function which has been often used to describe the nonlinear elastic behavior of skin tissue can be given as:

$$\sigma^e(\varepsilon) = A(e^{B\varepsilon} - 1) \quad (6)$$

where A is a linear parameter which has the same dimension as stress, and B is non-dimensional factor describing the nonlinearity of elastic response.

The optimization procedure was performed by using OriginLab to generate fit data to relaxation curve for skin tissue.

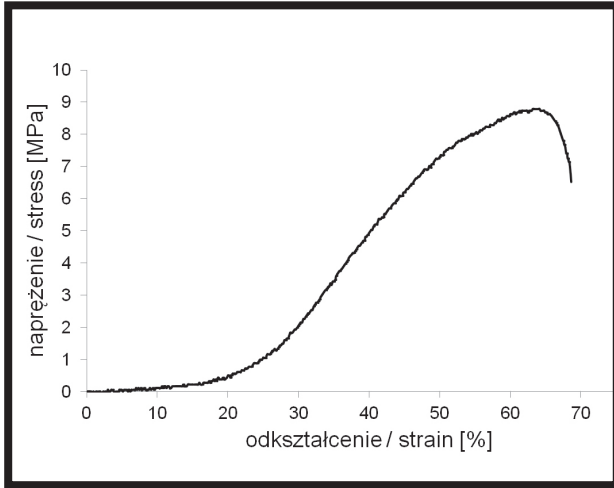
Results and Discussion

Preliminary uniaxial tensile tests were conducted to characterize the basic properties (modulus of elasticity, tensile strength) of the tissue samples (TABLE 1). The recorded stress-strain curves of test samples contain three characteristic areas of the skin tissue, as discussed in the introduction of this study (FIG. 1). In the first phase, lasting up to approx. 25% of the strain, a large deformation can be seen at a relatively low stress level. Characteristics of stress-strain in this step is approximately linear. In the second stage of elongation (25-60% strain), the rigidity of the material increases, and another area of the linear stress-strain curve occurs. In the third stage, when the strength is exceeded the sample is destroyed. While comparing the obtained test results to the results presented in the literature, great differences in the determined values of the strength parameters can be noticed. They result from the biological variety among animals, the sensitivity of biological tissues to sample test and storage conditions, problems with obtaining samples of identical dimensions (e.g. various thicknesses), as well as from the anisotropic character of skin [14].

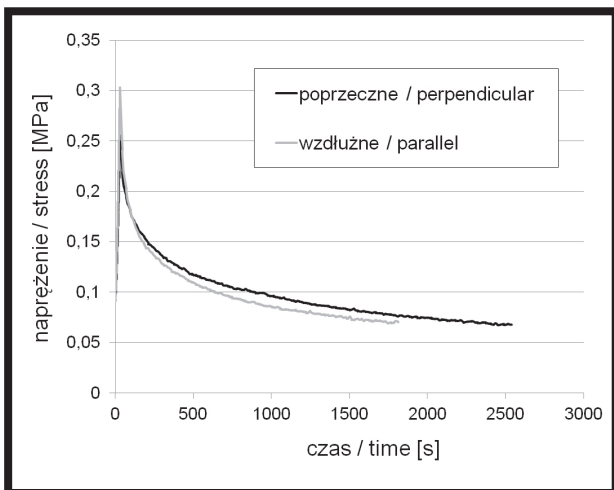
Relaxation tests showed that a fast relaxation was observed immediately after the strain was applied, followed by a moderate relaxation and finally a slight relaxation in time, depended on strain level and the direction of specimens taken.

TABELA 1. Wyniki testów rozciągania dla próbek skóry świńskiej.
TABLE 1. Results of tensile test for porcine skin samples.

Kierunek pobrania próbek Direction of samples taken	Moduł Younga Young's modulus [MPa]	Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [MPa]	Wydłużenie przy zerwaniu Elongation at break [mm]
równoległe/parallel	11.5 ±2.5	11.4 ±1.4	21.3 ±1.1
prostopadłe/perpendicular	19.0 ±2.1	13.0 ±1.7	34.4 ±4.7



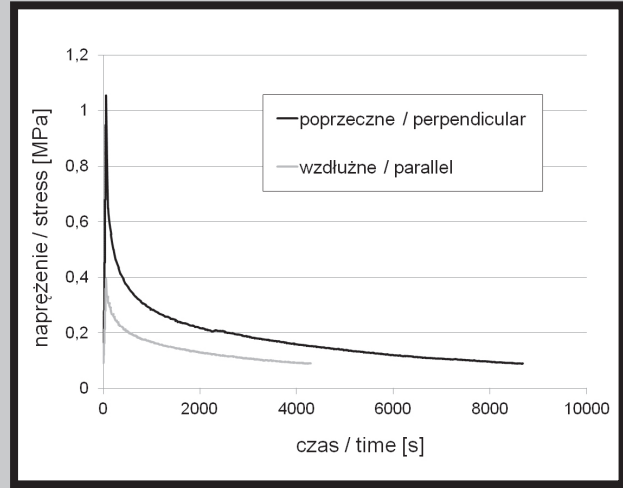
RYS. 1. Przykładowa krzywa napężenie-odkształcenie dla badanej skóry.
FIG. 1. An example of the stress-strain curve for the tested skin.



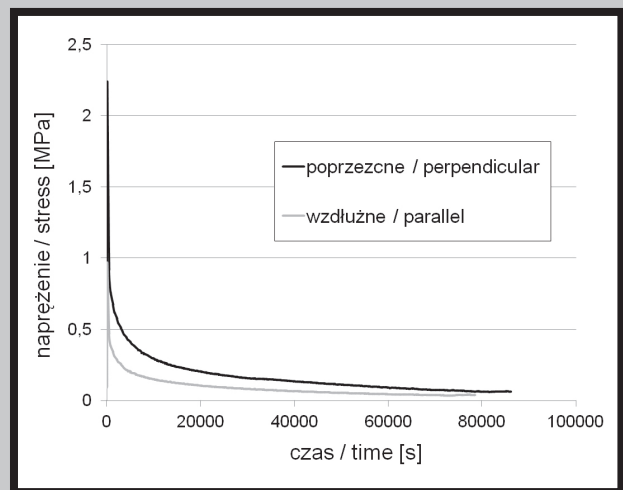
RYS. 2. Krzywe relaksacji naprężeń przy 5% poziomie odkształcenia dla próbek prostokątnych i równoległych.
FIG. 2. Stress relaxation curves at 5% strain for perpendicular and parallel samples.

Różne kierunki pobrania próbek wpływają na właściwości lepko-sprężyste. Dla 5% odkształcenia krzywe relaksacji dla obydwu kierunków pobrania próbek są podobne (RYS. 2). Różnica pomiędzy równoległymi i prostokątnymi próbkami jest widoczna dla poziomu odkształcenia 10 i 15% (RYS. 3 i 4). Czas relaksacji, napężenie wstępne i czas spadku naprężenia poniżej wartości naprężenia wstępnego są wyższe dla próbek prostokątnych dla dwóch wyższych poziomów odkształcenia (TABELA 2).

Dla próbek prostokątnych krzywe relaksacji dla odkształcenia 5% i 10% wykazują podobny trend relaksacji, krzywa relaksacji dla 15% odkształcenia charakteryzuje się szybką relaksacją w zakresie czasu 90 s do około 500 s testu. Po tym czasie krzywa relaksacji dla 15% odkształcenia wyglądała podobnie do krzywych relaksacji dla 5% i 10% odkształcenia. Dla próbek prostokątnych zostały osiągnięte następujące poziomy naprężenia początkowe: dla 5% odkształcenia około 0,3 MPa w 30 s, dla 10% odkształcenia około 1,1 MPa w 60 s i dla 15% odkształcenia 2,3 MPa w 90 s (TABELA 2).



RYS. 3. Krzywe relaksacji naprężeń przy 10% poziomie odkształcenia dla próbek prostokątnych i równoległych.
FIG. 3. Stress relaxation curves at 10% strain for perpendicular and parallel samples.



RYS. 4. Krzywe relaksacji naprężeń przy 15% poziomie odkształcenia dla próbek prostokątnych i równoległych.
FIG. 4. Stress relaxation curves at 15% strain for perpendicular and parallel samples.

The different directions of taking the samples influenced viscoelastic properties. At 5% strain relaxation curves for both specimens from both directions are similar (FIG. 2). The difference between parallel and perpendicular samples can be seen at strains of 10 and 15% (FIG. 3 and 4). The relaxation time, initial stress and time of decreasing stress below value of prestress was higher for perpendicular samples at two higher strains levels (TABLE 2).

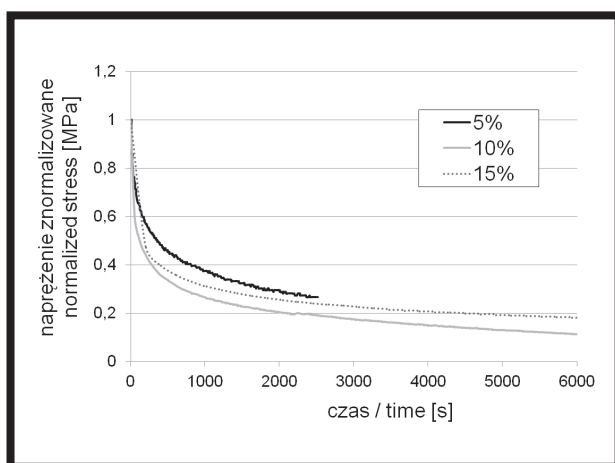
For the perpendicular samples the relaxation curves at strains of 5% and 10% showed a similar trend of relaxation while the curve at strain of 15% showed a relatively rapid relaxation from the time 90 s to about 500 s of the test. But after that time relaxation curve at 15% strain looked similar to stress relaxation curves at the 5 and 10% strain. The perpendicular samples achieved the following levels of initial stress: for 5% strain of about 0.3 MPa for 30 s at 10% strain of about 1.1 MPa for 60 s, and at 15% strain 2.3 MPa for 90 s (TABLE 2).

TABELA 2. Wyniki procesu relaksacji naprężeń.
TABLE 2. Results of stress relaxation tests.

Kierunek pobrania próbek Direction of sample taken	Odształcenie Strain [%]	Naprężenie początkowe Initial stress σ_0 [MPa]	Czas osiągnięcia wartości poniżej naprężeń wstępnych Time of decreasing stress below value of prestress [s]	Czas relaksacji Relaxation time [s]
prostopadłe/perpendicular	5	0.3	1 329	100
Równoległe/parallel	5	0.3	849	95
prostopadłe/perpendicular	10	1.1	8 508	150
równoległe/parallel	10	0.4	3 823	110
prostopadłe/perpendicular	15	2.3	61 930	1600
równoległe/parallel	15	1.0	25 895	1000

Dla próbek równoległych tendencja relaksacji naprężenia próbek odpowiadających 15% odkształcenia była podobna do próbek prostopadłych. Naprężenie początkowe osiągnięte dla próbek równoległych dla 5% odkształcenia wyniosło 0,3 MPa w 30 s, dla 10% odkształcenia 0,4 MPa w 60 s i dla 15% odkształcenia osiągnęło wartość 1 MPa w 90 s.

Znormalizowane naprężenia dla próbek pobranych w dwóch kierunkach różnią się. Dla próbek prostopadłych zaobserwowano szybką relaksację dla 15% odkształcenia natychmiast po obciążeniu, następnie umiarkowaną relaksację do 1500-3000 s i w końcu niewielką relaksację, aż do stanu równowagi przy 5000 s (RYS. 5). Dla próbek równoległych zaobserwowano szybką relaksację dla 15% odkształcenia natychmiast po obciążeniu, następnie umiarkowaną relaksację do 2500-4500 s i w końcu niewielką relaksację, aż do stanu równowagi przy 6000 s (RYS. 6). Dla wszystkich próbek naprężenie znormalizowane spadło do poziomu około 0,2 MPa.



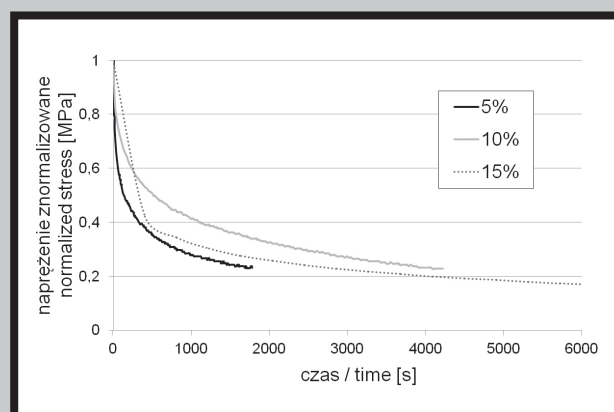
RYS. 5. Krzywe znormalizowanych relaksacji naprężeń dla trzech poziomów odkształceń próbek prostopadłych.

FIG. 5. Normalized stress relaxation curves at 3 strains for perpendicular samples.

Liu et. al badali proces relaksacji tkanki skórnej świńskiej dla tych samych poziomów odkształcenia. Dla równoległych próbek, dla obydwu 5% i 10% odkształcenia, naprężenie znormalizowane spadło do wartości 0,6 MPa, podczas gdy dla 15% odkształcenia do poziomu 0,4 MPa. Dla próbek prostopadłych, dla 5% i 10% odkształcenia, naprężenie znormalizowane zrelaksowało do 0,6 MPa, a dla 15% odkształcenia do poziomu poniżej 0,2 MPa. Różnice pomiędzy wynikami wynikają przede wszystkim z biologicznego charakteru materiału badawczego, innych warunków przechowywania oraz kondycjonowania próbek do badań.

For the parallel samples the tendency for stress relaxation of the sample corresponding to a 15% strain was similar for perpendicular samples. The initial stress is reached by the sample for 5% strain is 0.3 MPa for 30 s at 10% strain of 0.4 MPa for 60 s, and for 15% strain reached a value of 1 MPa for 90 s.

The normalized stress relaxations for the samples taken in two directions exhibit the different behavior. For perpendicular samples a fast relaxation at 15% strain was observed immediately after the strain was applied, followed by a moderate relaxation until 1500-3000 s and finally a slight relaxation till the equilibrium state 5000 s (FIG. 5). For parallel samples a fast relaxation at 15% strain was also observed immediately after the strain was applied, but it followed by a moderate relaxation until 2500-4500 s and finally a slight relaxation till the equilibrium state 6000 s (FIG. 6). All of the samples decayed to normalized stress of approximately 0.2 MPa.



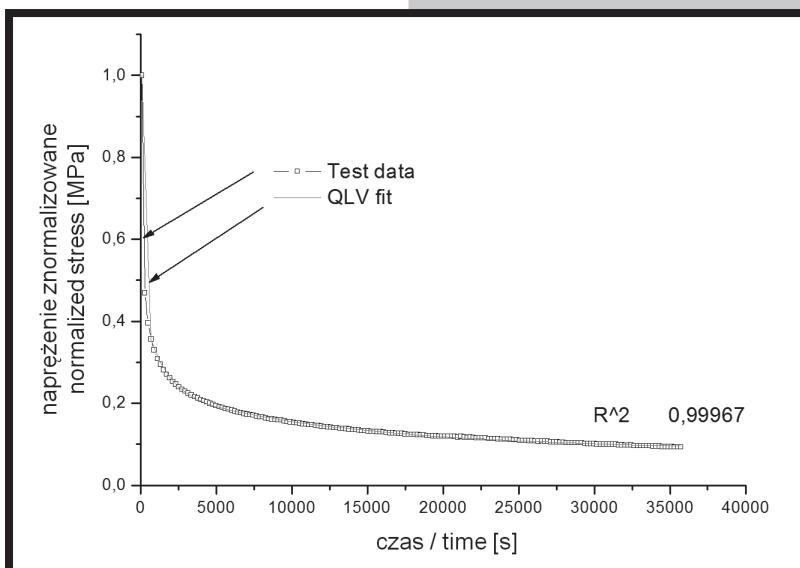
RYS. 6. Krzywe znormalizowanych relaksacji naprężeń dla trzech poziomów odkształceń próbek równoległych.

FIG. 6. Normalized stress relaxation curves at 3 strains for parallel samples.

Liu et. al tested relaxation of porcine skin tissue at the same strains. For parallel samples, at both 5% and 10% strains, a normalized stress decayed to approximately 0.6 MPa, whereas at 15% strain decayed to approximately 0.4 MPa. Perpendicular samples of 5% and 10% strains relaxed to just above a normalized stress of 0.6 MPa, and the 15% strain of samples relaxed to below 0.2 MPa. The differences between results are mainly due to the biological nature of the tested material and other conditions of storage and conditioning of the specimens.

Wyniki obliczenia modelu QLV dla prostopadłych próbek dla 15% odkształcenia pokazały dobre dopasowanie do wyników doświadczalnych relaksacji skóry (RYS. 7). Model QVL jest właściwy do opisu lepkosprężystych składowych odkształcenia tkanki skórnej. Wartości współczynników dla próbki prostopadłej dla odkształcenia na poziomie 15% oraz dla porównania wyniki Liu et al. zaprezentowano w TABELI 3.

Results of QLV model calculation for perpendicular sample with 15% strain showed a close fit with skin stress relaxation data (FIG. 7). The QVL model is suitable to describe the elastic and viscous components of the skin tissue. The coefficient values of perpendicular sample with 15% strain and for comparison results of Liu et al. are shown in TABLE 3.



RYS. 7. Porównanie modelowania QLV z krzywą doświadczalną dla próbki prostopadłej dla 15% odkształcenia.
FIG. 7. Comparison of modeling QLV with experimental data of perpendicular sample with 15% strain.

TABELA 3. Wartości współczynników modelu QLV dla próbki prostopadłej dla odkształcenia 15%.
TABLE 3. Coefficient values for QLV model of perpendicular sample with 15% strain.

Kierunek pobrania próbek / Odkształcenie Direction of sample taken / Strain	A	B	a	b	c	d	g	h
prostopadłe /15% perpendicular /15%	0.453	0.088	1.31447	0.21733	0.18186	0.008	0.00043	0.000019
prostopadłe /15% perpendicular /15% [12]	0.6514	0.839	1.483	0.1787	0.5766	0.0006	0.7228	0.01399

Wnioski

W pracy przedstawiono wyniki badań procesu relaksacji naprężeń próbek skóry świńskiej pobranych w dwóch kierunkach. Wyniki wskazują, że kierunek pobrania próbki wpływa na współczynnik szybkości relaksacji naprężeń. Tkanka skóry wykazuje podobny charakter relaksacji naprężeń dla dwóch niższych poziomów odkształceń, natomiast próbka z odkształceniem na poziomie 15% wykazuje znacznie mniejszy współczynnik szybkości relaksacji naprężeń. Wpływ właściwości anizotropowych skóry świńskiej na zjawiska relaksacji jest widoczny dla dwóch poziomów odkształcenia: 10 i 15%. Próbkę poprzeczną wykazywały dłuższy czas relaksacji.

Wyjaśnienie zaobserwowanych różnic w procesie relaksacji próbek wzdłużnych i poprzecznych wymaga przeprowadzenia dalszych badań. Na zaobserwowane różnice wpływ może mieć kilka czynników: zmiany w strukturze skóry, np. zmiany orientacji włókien kolagenowych, wartość zastosowanego odkształcenia, zjawiska relaksacji w poszczególnych elementach strukturalnych skóry, tj. kolagenie i matrycy [11].

Conclusions

In the study, the results of investigation of stress relaxation process for porcine samples taken in two directions were presented. The results showed that direction of skin samples influences on stress relaxation rate. Skin tissue has similar stress relaxation behavior at two lower strains but samples with 15% strain show much slower stress relaxation rate. The influence of the anisotropy of porcine skin on relaxation process has been observed for two levels of strain: 10 and 15%. The perpendicular samples had higher relaxation time.

Explanation of the observed differences in the relaxation process of parallel and perpendicular samples requires further investigation. The observed differences may be affected by several factors: changes in the structure of the skin, e.g. change in the orientation of collagen fibers; the value of the applied strain, the phenomena of relaxation of the individual structural elements of the skin, e.g. collagen and matrix [11].

Badania tego typu na modelach skóry świńskiej dostarczają podstawowych informacji dla zamykania ran bez napięcia tkanek. Podstawowym krokiem do oceny modelu skóry jest weryfikacja doświadczalna. Skóra zwierzęca wykorzystywana jest do pomiarów jakościowych i generowania modeli relaksacji naprężeń, lecz do analizy parametrów mechanicznych materiału wymagana jest ludzka skóra poddawana badaniom *in vitro* lub *in vivo* [1,4,15]. Model QLV może być wykorzystywany do modelowania zjawiska relaksacji naprężeń tkanki skóry.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach działalności statutowej M-1/6/2014/DS.

Such investigations in porcine models deliver the primary information of closing a wound without tension. The basic step in generated skin model is in experimental verification. The animal skin is used for qualitative measurements of tissue and creating stress relaxation models, but for analyzing mechanical material parameters human skin *in vitro* or *in vivo* is required [1,4,15]. The QLV model can be used to model stress relaxation process of skin tissue.

Acknowledgements

The work was realized due to statutory activities M-1/6/2014/DS.

Pismienictwo

- [1] Kathy F., Imberdis C., Vescovo P., Varchon D., Lagarde J.M.: Model of the viscoelastic behaviour of skin in vivo and study of anisotropy. *Skin Research Technology* 10 (2004) 93-103.
- [2] Lim K.H., Chew C.M., Chen P.C.Y., Jeyapalinac S., Hoc H.N., Rappel J.K., Lim B.H.: New extensometer to measure in vivo uniaxial mechanical properties of human skin. *Journal of Biomechanics* 41 (2008) 931-936.
- [3] Pailler-Mattei C., Beca S., Zahouani H.: In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Medical Engineering & Physics* 30 (2008) 599-606.
- [4] Ni Annaidh A., Bruyere K., Destrade M., Gilchrist M.D., Ottenio M.: Characterizing the anisotropic mechanical properties of excised human skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 5(1) (2012) 139-148.
- [5] Groves R.B., Coulman S.A., Birchall J.C., Evans S.L.: An anisotropic, hyperelastic model for skin: Experimental measurements, finite element modeling and identification of parameters for human and murine skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 18 (2013) 167-180.
- [6] Lemaitre J., *Handbook of Material Behavior. Nonlinear Models and Properties*, 10.11. Biomechanics of soft tissue, Academic Press, USA, (2001) 1057-1070.
- [7] Žak M., Kuropka P., Kobielarz M., Dudek A., Kaleta-Kuratowicz K., Szotek S.: Determination of the mechanical properties of the skin of pig fetuses with respect to its structure. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 13 (2) (2011) 37-43.

References

- [8] Łagan S., Liber-Kneć A.: Charakterystyka anizotropowych właściwości mechanicznych skóry świni. *Engineering of Biomaterials* 128-129 (2014) 61-63.
- [9] Ankersen J., Birkbeck A.E., Thomson R.D., Vanezis P.: Puncture resistance and tensile strength of skin stimulants. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers* (1999) 213 (part H) 493-501.
- [10] Elsner P., Wilhelm K.P., Maibach H.I., Berardesca E.: *Bioengineering of the skin: skin biomechanics*, CRC Press, New York, (2001).
- [11] Purslow P.P., Wess T.J., Hukins D.W.L.: Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *The Journal of Experimental Biology* 201 (1998) 135-142.
- [12] Liu Z., Yeung K.: The preconditioning and stress relaxation of skin tissue. *Journal of Biomedical and Pharmaceutical Engineering* 2:1 (2008) 22-28.
- [13] Fung Y.C., *Biomechanics, Mechanical properties of living tissues*, Springer, New York (1993).
- [14] Sherdold O.A., Fleck N.A., Radford D.: The uniaxial stress versus strain response of pig skin and silicone rubber at low and high strain rates. *International Journal of Impact Engineering* 32 (2006) 1384-1402.
- [15] Geerligs M.: *Skin layer mechanics*, Ph.D. Thesis, Technische Universiteit Eindhoven (2010) 27-30.

BADANIA *IN VITRO* AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ BIOSZKIEŁ ZAWIERAJĄCYCH Mg, Sr i Au WYTWORZONYCH METODĄ ZOL-ŻEL

LIDIA CIOŁEK^{1*}, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², MONIKA BIERNAT¹

¹ INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

² POLSKA AKADEMIA NAUK, INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ, UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCŁAW

*E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Streszczenie

Celem prowadzonych badań było określenie aktywności przeciwbakteryjnej *in vitro* bioaktywnych szkielec dotowanych Mg, Sr i Au. Przedstawiono badania zmodyfikowanych bioszkieł zawierających wybrane pierwiastki wprowadzone dla podwyższenia bioaktywności, które mogą wspomagać przebieg procesów fizjologicznych kościotworzenia i wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Obecność magnezu w składzie biomateriału zwiększa jego bioaktywność. Stront wpływa na lepszą proliferację komórek kostnych. Złoto należy do grupy „ultraelementów” działających przeciwbakteryjnie oraz aktywuje procesy metaboliczne poprzez oddziaływanie na enzymy. Silany użyte podczas syntezy bioszkieł metodą zol-żel, także mogą zwiększać ich bioaktywność.

Materiał odniesienia stanowiło bioszkieło P5-VS zawierające 70% mas. SiO₂, 5% mas. P₂O₅ oraz 25% mas. CaO. Bioszkieła P5-VS-1_Mg i P5-VS-1_Sr, o takim samym składzie jak P5-VS wytworzono zastępując 1% mas. CaO odpowiednio MgO lub SrO. W przypadku bioszkieł P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk nanocząsteczki złota były dodane w ilości 0,00065% mas. i 0,002% mas. odpowiednio jako: roztwór koloidalny lub niejonowe złoto koloidalne.

Właściwości fizykochemiczne wytworzonych bioszkieł obejmujące morfologię powierzchni, a także ich bioaktywność po kontakcie z roztworem symulującym osocze oraz wyniki cytotoksyczności zostały przedstawione w innym artykule. Stwierdzono, że bioszkieła w kontakcie z płynem symulującym osocze (SBF) są bioaktywne oraz nie oddziałują cytotoksycznie na komórki L929.

Wyniki badań *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej wytworzonych bioszkieł wykazały ich wyższą aktywność w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* niż *Pseudomonas aeruginosa*. Wzrost mikroorganizmów najbardziej hamowało bioszkieło P5-VS-1_Sr. Bioszkieło P5-VS bez udziału Mg, Sr lub Au wykazywało najsłabsze działanie przeciwbakteryjne.

Słowa kluczowe: bioszkieła, metoda zol-żel, cytotoksyczność, aktywność przeciwbakteryjna

[Inżynieria Biomateriałów 134 (2016) 25-30]

IN VITRO STUDIES OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOL-GEL BIOGLASSES CONTAINING Mg, Sr AND Au

LIDIA CIOŁEK^{1*}, ANDRZEJ OLSZYNA¹, EWA ZACZYŃSKA², ANNA CZARNY², MONIKA BIERNAT¹

¹ INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS, DEPARTMENT OF CERAMIC TECHNOLOGY, 9 POSTĘPU STREET, 02-676 WARSAW, POLAND

² POLISH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, 12 RUDOLF WEIGL STREET, 53-114 WROCLAW, POLAND

*E-MAIL: L.CIOLEK@ICIMB.PL

Abstract

The aim of this study was to determine *in vitro* antibacterial activity of bioactive glasses doped with Mg, Sr and Au. Authors showed tests of modified bioglasses containing selected elements incorporated to the composition in order to increase bioactivity, which could contribute to physiological processes of osteogenesis and exhibit bactericidal activity. The presence of magnesium in the composition of the biomaterial enhances its bioactivity. Strontium improves the proliferation of bone cells. Gold belongs to the group of “ultra-elements” which show antibacterial activity and activate metabolism by acting on enzymes. The silane used for the synthesis of sol-gel bioglasses may also increase bioactivity.

Bioglass P5-VS containing 70 wt% of SiO₂ and 25 wt% of CaO and 5 wt% of P₂O₅ was a reference material. Bioglasses P5-VS-1_Mg and P5-VS-1_Sr with the same composition as P5-VS were obtained by substituting 1 wt% of CaO by MgO or SrO respectively. In the case of bioglasses P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk nanoparticles of Au were added in the amount of 0.00065 wt% and 0.002 wt% as colloidal solution or nonionic colloidal gold respectively.

Physical and chemical properties of sol-gel bioactive glasses including grain morphology and bioactivity in simulated body fluid and the results of cytotoxicity were presented in a previous publication. It was found that bioglasses were bioactive in contact with simulated body fluid (SBF) and were not toxic on L929 cells *in vitro*.

The results of *in vitro* antibacterial activity studies of obtained bioglasses showed higher activity against strain of *Staphylococcus aureus* than *Pseudomonas aeruginosa*. The growth of microorganisms was inhibited in the most effective way by the bioglass P5-VS-1_Sr. The P5-VS bioglass without Mg, Sr or Au shows the weakest bactericidal effect.

Keywords: bioglass, sol-gel method, cytotoxicity, antibacterial activity

[Engineering of Biomaterials 134 (2016) 25-30]

Poważnym powodem niepowodzeń w integracji tkankowej biomateriałów są zakażenia pooperacyjne [1]. Stąd, podczas stosowania leczenia z użyciem biomateriałów do regeneracji tkanek, w miejsce implantacji wprowadzane są materiały, które mają zdolność wydzielania antybiotyków. Jednak takie rozwiązania mają również działanie niekorzystne związane z pojawiającymi się reakcjami alergicznymi, zubożeniem flory bakteryjnej czy opornością bakterii wobec antybiotyków [2]. Stąd ciągle poszukuje się nowych rozwiązań i doskonalą ich integrację z tkankami organizmu. Oczekuje się lepszej integracji biomateriału z tkanką kostną poprzez tworzenie apatytowej warstwy pośredniej, zapewniającej wiązanie z kością. Niezwykle istotne są także właściwości biomateriałów wpływające na szybkość resorpcji lub ich pełną resorbowalność i zastąpienie nową tkanką. Ideałem byłoby opracowanie biomateriału o działaniu bakteriobójczym i szybkości resorpcji skorelowanej z tworzeniem nowej tkanki kostnej.

Proces tworzenia warstwy apatytu na powierzchni bioszkieł inicjują uwalniane jony wapnia łączące się z anionami fosforanowymi obecnymi w płynie ustrojowym [3,4]. Obecność innych jonów, w tym jonów fosforu w składzie biomateriału jest również korzystna. Modyfikacja składu bioszkieł poprzez częściowe zastąpienie w sieci szkła jonów Ca^{2+} jonami Mg^{2+} lub Sr^{2+} wpływa więc na wzrost reaktywności powierzchniowej bioszkieł, co podwyższa zdolność tworzenia apatytu podczas kontaktu z płynem fizjologicznym.

Obecność jonów Mg^{2+} w biomateriale powoduje, że pod względem chemicznym powstająca warstwa apatytu jest podobna do apatytu biologicznego [5], a dodatkowo jony te pełnią ważną funkcję w procesach metabolicznych stymulując produkcję blaszek kostnych. Obecność w biomateriale jonów strontu działających osteoindukcyjnie wpływa na lepszą proliferację komórek kostnych [6,7]. Natomiast złoto należy do grupy ultraelementów działających przeciwbakteryjnie oraz aktywuje procesy metaboliczne poprzez oddziaływanie na enzymy [8]. Mechanizm działania przeciwbakteryjnego nanocząstek złota w kontakcie z bakteriami *Escherichia coli* opisany przez Cui Y. et al. [9] opiera się m.in. na zmianie potencjału błonowego i hamowaniu aktywności syntazy ATP. Nanocząstki złota stwarzają perspektywę do ich stosowania w inżynierii biomateriałów [10].

Na właściwości bioszkieł w głównej mierze wpływa ich skład chemiczny. Do nadania właściwości przeciwbakteryjnych mogą być wykorzystane uwalniane z biomateriału jony niektórych metali uznanych za cytotoksyczne [11]. Jednak nawet bez udziału tych jonów bioaktywne szkła w kontakcie z niektórymi bakteriami wykazują słabe działanie bakteriobójcze. Mechanizm tego działania może wynikać z kombinacji różnych czynników, w tym z podwyższenia pH podczas uwalniania jonów z sieci bioszkieł [12]. Zastosowanie niektórych silanów jako reagentów do syntezy bioszkieł metodą zol-żel, także może zwiększać ich bioaktywność [13]. Bioszkło z udziałem winylotrimetoksylanu (VS) w testach *in vitro* wykazuje mniejszy stopień cytotoxyczności [14].

W prezentowanej pracy przedstawiono badania nad otrzymywaniem zmodyfikowanych bioszkieł zawierających wybrane pierwiastki dla wytworzenia biomateriałów o podwyższonej bioaktywności, które mogłyby wspomagać przebieg procesów fizjologicznych kościotworzenia i wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Obecność nawet niewielkich ilości proponowanych pierwiastków powinna wpływać na aktywność enzymów związanych z działaniem komórek kostnych.

Introduction

Post-operative infections are an important reason of failures in the tissue integration of biomaterials [1]. Hence during the therapy of tissue regeneration with the use of biomaterials, materials with the ability of antibiotic's release are implemented in the treated site. Such option however has also disadvantages related to allergic reactions, microbial flora depletion or bacterial resistance [2]. For these reasons new solutions are still sought and integration of materials with body's tissue is being improved. A better integration of biomaterial with bone tissue through the formation of intermediate apatite layer which will provide the bonding with a bone is expected. Biomaterials' properties which influence the rate of resorption or their total resorption and substitution with new bone tissue are also very important. Development of biomaterial with bactericidal effect and a rate of resorption correlated with a new tissue creation will be the ideal solution.

The process of apatite-like layer's formation on the surface of bioglasses is initiated by releasing of calcium ions which join with phosphate anions present in body fluid [3,4]. The presence of other ions is also advantageous, including phosphorus ions in biomaterial's composition. The modification of composition of bioglasses through a partial replacement of Ca^{2+} ions in the network of glass with ions of Mg^{2+} or Sr^{2+} affects the increase in surface reactivity of bioglasses, which improves the ability of apatite formation during the contact with body fluid.

The presence of Mg^{2+} ions in biomaterial's composition results in chemical similarity of the apatite layer created in the process to biological apatite [5], and additionally these ions perform an important function in metabolic processes via stimulation of production of bone lamellae. The presence of Sr^{2+} ions with osteoinduction function within biomaterial contributes to a better proliferation of bone cells [6,7]. Gold belongs to ultraelements' group of antimicrobial performance and it activates metabolic processes through affecting enzymes [8]. The mechanism of the antibacterial activity of gold nanoparticles in contact with *Escherichia coli* described by Cui Y. et al. [9] is consisting, partly in changing of membrane potential and inhibiting the activity of ATP synthase. There is a promising prospect of application of gold nanoparticles in engineering of biomaterials [10].

Properties of bioglasses are determined mainly by their chemical composition. In order to achieve their antibacterial properties, ions of some metals considered as cytotoxic should be released from the bioglass [11]. But even in the absence of these ions, bioglasses can show a limited antibacterial activity in contact with some bacteria. Mechanism of this action can be explained as a result of combination of several factors including the increase in pH during the action of other ions release from bioglass network [12]. Application of some silanes as reagents for the synthesis of bioglasses by sol-gel method may also increase their bioactivity [13]. The bioglass with a share of vinyltrimethoxysilane (VS) in *in vitro* tests showed a smaller cytotoxicity degree [14].

On the basis of the findings presented above, research on new bioglasses containing selected elements was undertaken. It was aimed at bioglasses applicable as biomaterials with increased bioactivity, which would strengthen physiological processes of osteogenesis and would exhibit antibacterial activity. The presence of even slight amounts of proposed elements should influence the activity of enzymes related to bone cells.

Materiały i metody

Opracowano cztery bioszklą dotowane Mg, Sr i Au oraz bioszklą P5-VS bez dodatków jako materiał odniesienia. Bioszklą P5-VS zawierającą 70% mas. SiO_2 , 5% mas. P_2O_5 oraz 25% mas. CaO wytworzono używając jako zasadniczych substratów: tetraetoksylanu (TEOS), winylotrietoksylanu (VS), azotanu wapnia czterowodnego i fosforanu trietylowego. Bioszklą P5-VS-1_Mg i P5-VS-1_Sr, o takim samym składzie jak P5-VS wytworzono zastępując 1% mas. CaO odpowiednio MgO lub SrO. W przypadku bioszkieł P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk, nanocząsteczki złota były dodane w ilości 0,00065% mas. i 0,002% mas. odpowiednio jako: roztwór koloidalny lub niejonowe złoto koloidalne. Proces wytworzenia bioszkieł metodą żol-żel przeprowadzono uwzględniając wcześniej opisaną metodykę [8]. Wytworzone bioszklą były bioaktywne po inkubacji w roztworze SBF, co potwierdziły badania SEM. Na powierzchni bioszkieł tworzyły się agregaty struktur typowych dla morfologii apatytu uzyskiwanego w sposób biomimetyczny. Na powierzchni próbek P5-VS i P5-VS-1_Mg powstał apatyt płatkowy. Badania *in vitro* działania cytotoksycznego wytworzonych bioszkieł pozwoliły stwierdzić brak efektu toksycznego na linię L929 komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy (ATCC CCL 1). Bioszklą dotowane Mg lub Sr lub Au, w metodzie bezpośredniej przy stężeniu 20 mg/ml, wykazały znacznie niższą cytotoksyczność w porównaniu do bioszklą odniesienia P5-VS. Przy kontakcie bezpośrednim na przeżywalność komórek miało wpływ stężenie - najlepsze wyniki uzyskano przy 5 mg/ml. Obrazy morfologiczne hodowli komórkowych w metodzie pośredniej, po kontakcie L929 z eluatami badanych bioszkieł, były prawidłowe, a proliferacja oznaczona po 48 h miała tendencję wzrostową [8].

W badaniach działania przeciwbakteryjnego bioszkieł wykorzystano następujące szczepy bakteryjne: *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058 i *Staphylococcus aureus* PCM 2054 (Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów - PCM). Do studzienek na sterylnej 24-dółkowej płytce plastikowej zawierającej po 1 ml bulionu odżywczego наносzono bioszklą (wysterylizowane promieniowaniem UV), w stężeniu: 1 mg/ml; 5 mg/ml; 10 mg/ml; 20 mg/ml oraz 50 mg/ml, następnie dodawano po 100 μl hodowli bakteryjnej. Płytki inkubowano w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$ przez 24 godziny, 48 godzin oraz 7 dni, po tym czasie hodowle rozcieńczano i wysiewano. Podłoża inkubowano w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$, po 18 godzinach inkubacji liczono kolonie. Kontrole stanowiły hodowle bulionowe poszczególnych mikroorganizmów, bez testowanych bioszkieł.

Wyniki i dyskusja

Na RYS. 1 i RYS. 2 przedstawiono wyniki aktywności przeciwbakteryjnej dla różnych stężeń bioszkieł oznaczone po 48 h, odpowiednio w stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Wyniki tych testów wskazują, że kontakt ze wszystkimi bioszklami prowadzi do zmniejszenia ilości bakterii. Najlepsze wyniki uzyskano dla próbek o najwyższym stężeniu badanych bioszkieł.

Z danych przedstawionych na wykresach wynika, że wszystkie badane bioszklą wpływały na obniżenie liczby bakterii. Najlepsze działanie przeciwbakteryjne zarówno w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* jak i *Staphylococcus aureus* obserwowano przy stężeniu 50 mg/ml, przy czym szczep *Staphylococcus aureus* był bardziej wrażliwy. Na RYS. 3 i RYS. 4 przedstawiono przeżywalność szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* przy stężeniu 20 mg/ml badanych bioszkieł oznaczoną po upływie 24 h, 48 h i 168 h.

Materials and Methods

Four bioglasses doped with Mg, Sr and Au and an undoped bioglass P5-VS as a reference material were obtained. Bioglass P5-VS containing 70 wt% of SiO_2 and 25 wt% of CaO and 5 wt% of P_2O_5 being a reference material was produced using tetraethoxysilane, vinyltriethoxysilane (VS), calcium nitrate tetrahydrate and triethyl phosphate as basic substrates. Bioglasses P5-VS-1_Mg and P5-VS-1_Sr with the same composition as P5-VS were obtained by substituting 1 wt% of CaO by MgO or SrO, respectively. In the case of bioglasses P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk nanoparticles of Au were added in the amount of 0.00065 wt% and 0.002 wt% as colloidal suspension or non-ionic colloidal gold, respectively. The process of preparing bioglasses by sol-gel method was carried out according to procedures described in earlier reports [8]. The bioglasses obtained were bioactive after incubation in SBF solution, what was confirmed by SEM tests. On the surface of the bioglasses some aggregates were formed which were typical structures for morphology of apatite obtained in biomimetic way. On the surface of samples P5-VS and P5-VS-1_Mg flake-shaped particles of apatite were formed.

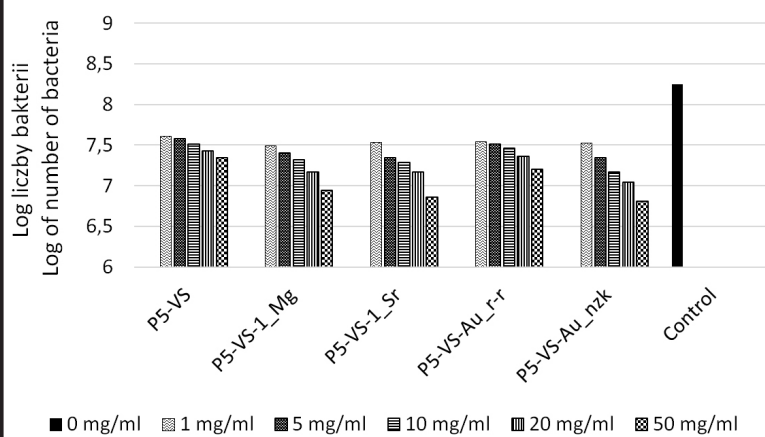
The *in vitro* tests of cytotoxic activity of the obtained bioglasses showed the lack of toxic effect to L929 line of fibroblast-like cells obtained from the subdermal fat tissue of mice (ATCC CCL 1). Bioglasses doped by Mg or Sr or Au, in direct method in the concentration of 20 mg/ml, showed significantly lower cytotoxicity in comparison to reference bioglass P5-VS. In a direct contact, the concentration influenced survivability of cells; the best results were obtained for 5 mg/ml. Morphological images of cell cultivations in the indirect method, after a contact of L929 with eluates of examined bioglasses were correct, and proliferation indicated after 48 h was tended to increase [8].

Studies of antibacterial activity were performed by using bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* PCM 2058 and *Staphylococcus aureus* PCM 2054 (PCM-Polish Collection of Microorganisms). To the wells of sterile 24-well plastic plate containing 1 ml nutrient broth, was applied UV sterilized bioglass at the following concentration of 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml and 50 mg/ml and 100 μl of bacterial culture. The plates were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h, 48 h and 7 days after which time the bacterial cultures were diluted and plated. After 18 h incubation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antibacterial activity of bioglasses was identified by colony counting. The controls consisted of broth cultures of microorganisms without bioglasses.

Results and Discussions

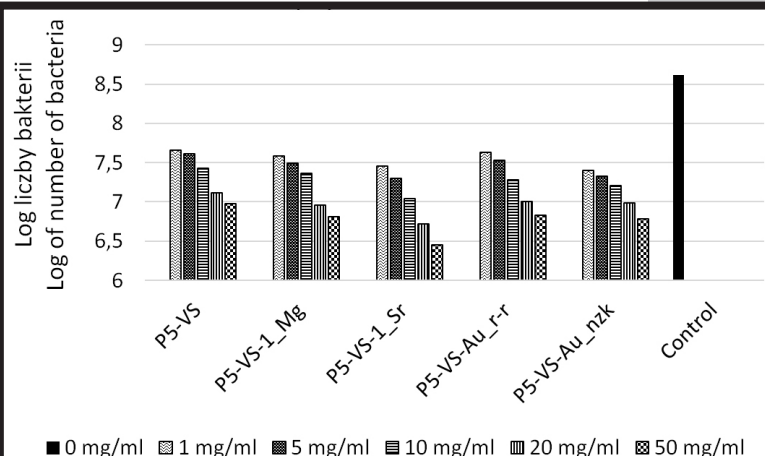
FIG. 1 and FIG. 2 show the results of antibacterial activity tests of bioglasses in different concentrations after 48 h on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, respectively. Results of these tests indicate that all of them lead to reduction of the number of bacteria. The best results were obtained using the highest concentration of bioglass samples.

The results showed that all the bioglasses tested had an impact on the decrease in the number of bacteria. The best antimicrobial effect was observed for the concentration of 50 mg/ml for both *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The evaluated antibacterial effect of the bioglasses tested was more effective for *Staphylococcus aureus* strain. FIG. 3 and FIG. 4 show viability of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* at the concentration of 20 mg/ml of tested bioglasses after 24 h, 48 h and 168 h.



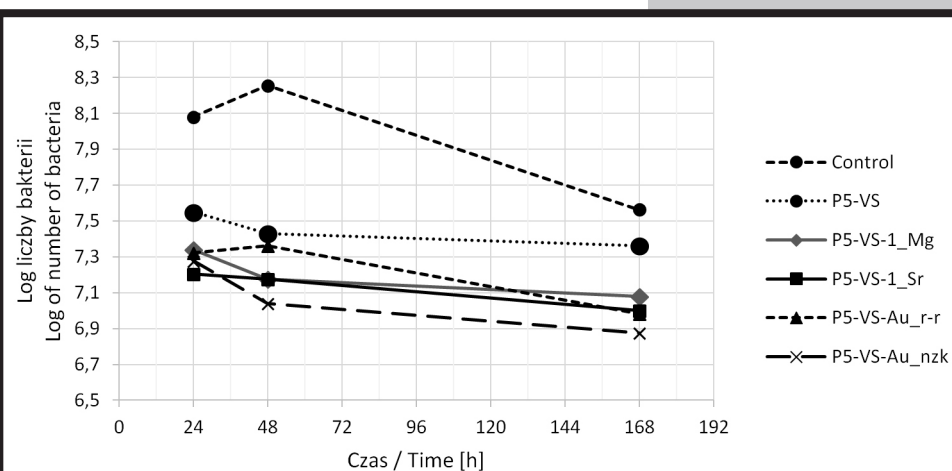
RYS. 1. Przeżywalność *Pseudomonas aeruginosa* w zależności od stężenia 1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml i 50 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk oznaczona po 48 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 1. Relation of the survival of *Pseudomonas aeruginosa* to concentrations 1.0 mg/ml, 5.0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml and 50 mg/ml of bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk determined after 48 h (representative experiment).



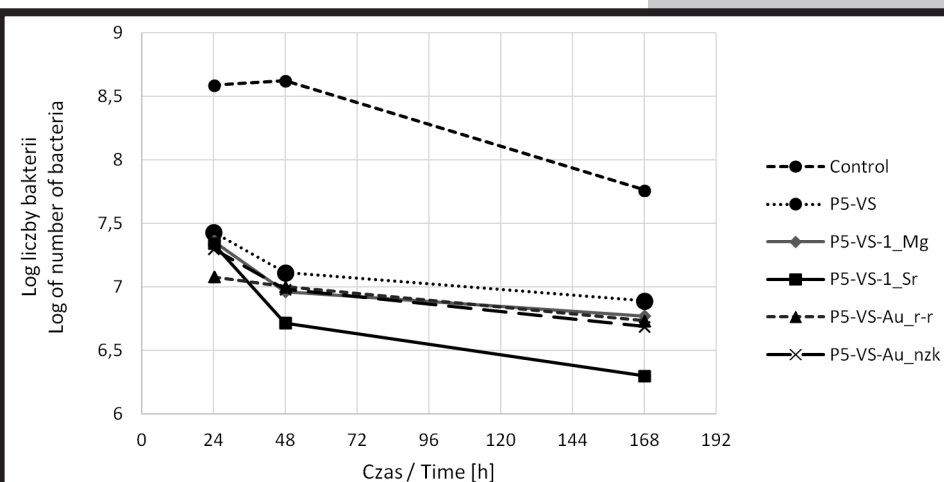
RYS. 2. Przeżywalność *Staphylococcus aureus* w zależności od stężenia 1,0 mg/ml, 5,0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml i 50 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r i P5-VS-Au_nzk oznaczona po 48 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 2. Relation of the survival of *Staphylococcus aureus* to concentrations 1.0 mg/ml, 5.0 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml and 50 mg/ml of bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk determined after 48 h (representative experiment).



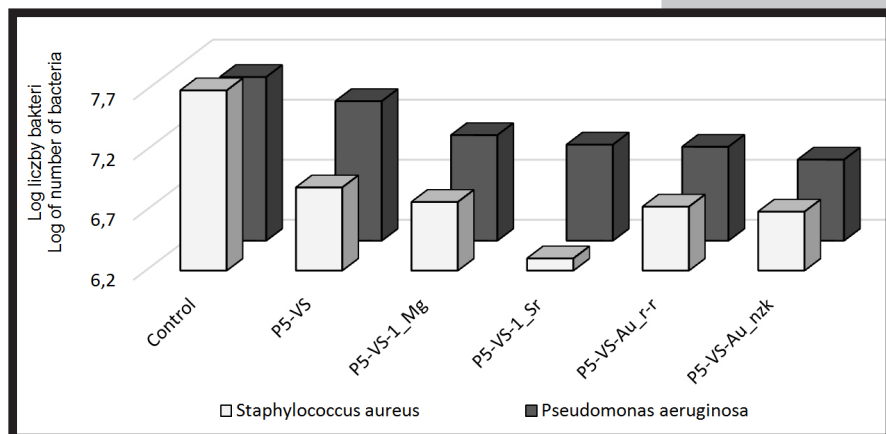
RYS. 3. Działanie przeciwbakteryjne bioszkieł przy stężeniu 20 mg/ml na *Pseudomonas aeruginosa* po upływie 24 h, 48 h i 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 3. Antibacterial activity of bioglasses at 20 mg/ml concentration on *Pseudomonas aeruginosa* after 24 h, 48 h and 168 h (representative experiment).



RYS. 4. Działanie przeciwbakteryjne bioszkieł przy stężeniu 20 mg/ml na *Staphylococcus aureus* po upływie 24 h, 48 h i 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 4. Antibacterial activity of bioglasses at 20 mg/ml concentration on *Staphylococcus aureus* after 24 h, 48 h and 168 h (representative experiment).



RYS. 5: Przeżywalność bakterii przy stężeniu 20 mg/ml bioszkieł P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk oznaczona po 168 h (doświadczenie reprezentatywne).

FIG. 5: Survival of strains determined after 168 h at a concentration of 20 mg/ml bioglasses P5-VS, P5-VS-1_Mg, P5-VS-1_Sr, P5-VS-Au_r-r and P5-VS-Au_nzk (representative experiment).

Porównanie działania przeciwbakteryjnego badanych bioszkieł w funkcji czasu przy stężeniu 20 mg/ml pokazuje, że wraz z upływem czasu liczba bakterii maleje. Jedynie po 48 h obserwowano wzrost liczby *Pseudomonas aeruginosa* będącego w kontakcie z bioszkieł P5-VS-Au_r-r. W stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa* (RYS. 3) najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wykazało bioszkieło P5-VS-Au_nzk, a w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* (RYS. 4) bioszkieło P5-VS-1_Sr. RYS. 5 przedstawia wyniki aktywności przeciwbakteryjnej na obydwie wybrane szczepy przy stężeniu 20 mg/ml badanych bioszkieł. Przeżywalność bakterii w kontakcie z badanymi bioszkiełami oceniona po 168 h była wyższa dla szczepu *Pseudomonas aeruginosa*.

Aktywność przeciwbakteryjna biomateriałów uzależniona jest od rodzaju nośnika, typu nanocząstek, rozproszenia nanocząstek na powierzchni oraz jej chropowatości. Działanie to zależy również od budowy ściany komórkowej drobnoustrojów [15]. Ściana komórkowa pałeczek Gram-ujemnych (*Pseudomonas*) zawiera około 20% peptydoglikanu i błonę zewnętrzną, w skład której wchodzi lipopolisacharydy i białka [16]. Głównym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-dodatnich (*Staphylococcus*) jest peptydoglikan (90%) oraz kompleks polimerów kwasu lipoteichoowego [17]. Domieszka odpowiednich nanocząstek może zwiększać aktywność przeciwbakteryjną biomateriałów.

Guida i in. [18] badali wpływ Sr na właściwości przeciwbakteryjne cementów szkło-jonomerowych zawierających fluor przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *Streptococcus* i *Actinomyces*. Okazało się, że dodanie strontu znacząco hamowało wzrost bakterii, co było związane raczej z wydzielaniem strontu niż fluoru lub ich działaniem synergistycznym. Po dodaniu strontu aktywność przeciwbakteryjna wyraźnie wzrastała mimo powolnego uwalniania fluoru. Z kolei Gary i in. [19] wykazali, że stront dodany do próbek hydroksyapatytu z domieszką srebra (HA-Ag) powodował podniesienie ich aktywności bakteriobójczej przeciwko Gram-ujemnym pałeczkom *Pseudomonas aeruginosa* i zmniejszenie efektu cytotoksycznego tych próbek w porównaniu do próbek HA lub HA-Sr. Wyniki te wskazują, że możliwe jest uzyskanie materiałów nietoksycznych dla komórek i jednocześnie hamujących wzrost bakterii.

W naszych badaniach bioszkieło P5-VS bez dodatku Mg, Sr lub Au charakteryzowało się najsłabszym działaniem przeciwbakteryjnym. Domieszka Sr, Au czy Mg zwiększała aktywność przeciwbakteryjną w zależności od rodzaju mikroorganizmu. Szczep Gram-dodatni *Staphylococcus aureus* okazał się bardziej wrażliwy na działanie bioszkieła P5-VS-1_Sr niż Gram-ujemne pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*. Z kolei próbki bioszkieła P5-VS-Au_nzk bardziej hamowały wzrost szczepu *P. aeruginosa* niż *S. aureus*. Lima i in. [20] wykazali, że domieszka Au może powodować silne zahamowanie wzrostu Gram-ujemnych pałeczek *Escherichia coli* oraz *Salmonella typhi* w krótkim czasie (90 min).

The comparison of bactericidal function of studied bioglasses over time and in the concentration of 20 mg/ml show that the number of bacteria decreased with time. The biggest antimicrobial effect in relation to *Pseudomonas aeruginosa* strain (FIG. 3) was observed in the case of the P5-VS-Au_nzk bioglass and in relation to *Staphylococcus aureus* strain (FIG. 4) it was the P5-VS-1_Sr bioglass. After 48 h, the proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in contact with P5-VS-Au_r-r bioglass was observed. FIG. 5 shows the result of antibacterial activity of tested bioglasses at the concentration of 20 mg/ml on both selected strains. The survivability of bacteria in contact with bioglasses after 168 h was higher for *Pseudomonas aeruginosa* strain.

Antimicrobial activity of biomaterials depends on the type of carrier and the kind of nanoparticles, dispersion of nanoparticles on the biomaterial surface and its roughness. Structure of the bacterial cell wall is an important factor influencing antibacterial activity of biomaterials [15], as well. The wall of Gram-negative bacteria contains 20% peptidoglycan and an outer membrane is rich in lipopolisaccharides and proteins [16]. Peptidoglycan (90%) and complex polymers of lipoteichoic acid [17] are main components of cell wall of most Gram-positive bacteria (*S. aureus*). Addition of specific nanoparticles can therefore enhance antimicrobial activity of biomaterials.

Guida et al. [18] have studied influence of Sr on antibacterial actions of glass ionomer cement with fluoride, against Gram-positive bacteria, *Streptococcus* and *Actinomyces*. They have demonstrated that antibacterial activity of glass ionomer cement was due to strontium release in higher degree than to fluoride release, or to a synergistic effect involving strontium and fluoride ions. Antibacterial effect at low fluoride release was significantly enhanced when strontium was added. Results of Gary et al. [19] indicate that addition of SrO to hydroxyapatite containing silver (HA-Ag) samples, was able to reduce effectively cytotoxicity and to improve bactericidal properties against Gram-negative strain *Pseudomonas aeruginosa*, compared to HA or HA-Sr samples. These studies have shown that it is possible to create appropriate materials that are non-toxic for cells, and able to inhibit bacteria growth.

In our research bioglass P5-VS without addition of Mg, Sr or Au showed the weakest antibacterial effect. Addition of Sr, Au or Mg increased antibacterial activity, but its intensity depended on the type of microorganism involved. Bioglass P5-VS-1_Sr inhibited growth of Gram-positive strain *Staphylococcus aureus*, much better than that of Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* strain was inhibited in the most effective way by bioglass P5-VS-Au_nzk. Lima et al. [20] showed that addition of Au might cause strong inhibition of growth of Gram-negative *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* in a short time equal to 90 min.

Zeolity zawierające 2,5% wag. cząsteczek Au wielkości 5 nm eliminowały 90-95% tych bakterii [20]. W naszych badaniach nie uzyskano tak znaczącego przeciwbakteryjnego działania bioszkieł, co przypuszczalnie było związane z niskim stężeniem nanocząsteczek Au (0,00065% wag. roztworu koloidalnego lub 0,002% wag. niejonowego koloidalnego złota) w testowanych próbkach. Aktywność przeciwbakteryjna badanych przez nas bioszkieł wzrastała wraz ze wzrostem stężenia tych próbek, co wynikało prawdopodobnie ze zwiększonej ilości poszczególnych typów nanocząsteczek. Dodanie do podstawowego składu bioszkieła odpowiednio dobranych ilości i rodzaju nanocząsteczek powinno pozwolić na uzyskanie optymalnych właściwości przeciwbakteryjnych.

Wnioski

Wyniki badań *in vitro* aktywności przeciwbakteryjnej wskazują na większą efektywność badanych bioszkieł w stosunku do szczepu *Staphylococcus aureus* niż do *Pseudomonas aeruginosa*. Dla wyższych stężeń bioszkieł działanie przeciwbakteryjne było większe. W badanym okresie czasu wzrost liczby bakterii szczepu *Staphylococcus aureus* najbardziej hamowało bioszkieło P5-VS-1_Sr, a szczepu *Pseudomonas aeruginosa* bioszkieło P5-VS-Au_nzk. Bioszkieło P5-VS bez udziału Mg, Sr lub Au wykazywało najsłabsze działanie przeciwbakteryjne.

Podziękowania

Praca została sfinansowana ze środków na działalność statutową Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Zeolites containing 2.5 wt% Au small particles (5 nm) on the surface, eliminated the 90-95% of bacteria [20]. In our experiments we haven't reached such a significant antibacterial activities, what presumably could result from the low concentration of Au nanoparticles, (0.00065 wt% colloidal solution and 0.002 wt% nonionic colloidal gold nanoparticles) in tested samples. Antibacterial activity of tested bioglasses was increasing with the increase in concentrations of the samples, which resulted probably from the increased quantities of each type of nanoparticles. Addition of appropriately selected types and quantities of nanoparticles to the basic composition of the bioglass should permit obtaining optimal antimicrobial properties.

Conclusions

The results of *in vitro* antibacterial activity studies of bioglasses in selected strains of bacteria showed higher activity against *Staphylococcus aureus* than *Pseudomonas aeruginosa*. For higher concentrations of tested bioglasses the antimicrobial effect was higher. The P5-VS bioglass without Mg, Sr or Au addition shows the weakest bactericidal effect. During the test, the growth of *Staphylococcus aureus* strain was inhibited in the most effective way by the P5-VS-1_Sr bioglass, and the growth of *Pseudomonas aeruginosa* strain was inhibited in the most effectively way by the P5-VS-Au_nzk bioglass.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw for providing financial support to this project.

Pismienictwo

- [1] Confalonieri M., et al.: Microbiological patterns in osteoarticular prosthetic infections. GIMMOC, VII(1)(2003) 21-26.
- [2] Verne E. et al.: Surface characterization of silver-doped bioactive glass. Biomaterials 26 (2005) 5111-5119.
- [3] Nałęcz M., Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, T.4, Biomateriały, Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003
- [4] Vallet-Regi M. et al.: XRD, SEM-EDS, and FTIR studies of *in vitro* growth of an apatite-like layer on sol-gel glasses. Journal of Biomedical Material Research 44 (1999) 416-421.
- [5] Gorustovich A. A. et al.: Osteoconductivity of strontium-doped bioactive glass particles: A histomorphometric study in rats. Journal of Biomedical Material Research 92A (2010) 232-237.
- [6] Gentleman E et al.: The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. Biomaterials 31 (2010) 3949-3956.
- [7] Hoppe A., et al.: A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glass and glass-ceramics. Biomaterials 32 (2011) 2757-2774.
- [8] Simon S. et al.: Gold nanoparticles developed in sol-gel derived apatite - bioactive glass composites. Journal of Materials Science: Material in Medicine 23 (2012) 1193-1201.
- [9] Cui Y. et al.: The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. Biomaterials 33 (2012) 2327-2333.
- [10] Rajan A., et al.: Studies on catalytic, antioxidant, antibacterial and anticancer activities of biogenic gold nanoparticles. Journal of Molecular Liquids 212 (2015) 331-339.
- [11] Wataha J.C.: The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism. Journal of Biomedical Materials Research 25 (1991) 1133-1149.

References

- [12] Lepparanta O. et al.: Antibacterial effect of bioactive glass on clinically important anaerobic bacteria in vitro. Journal of Materials Science Materials in Medicine 19 (2008) 547-551.
- [13] Kim Y. et al.: Preparation of bioactive microspheres of organic modified calcium silicates through sol-gel processing, Journal of Sol-Gel Science and Technology 45 (2008) 43-49.
- [14] Ciolek L. et al.: Badania właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności *in vitro* bioszkieł dotowanych Mg, Sr, Au. Prace Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych 16 (2014) 17-28.
- [15] Abadeer N.S., Fulop G., Chen Si, Kall M., Murphy C.J.: Interactions of Bacterial Lipopolysaccharides with Gold Nanorod Surface Investigate by refractometric sensing. ACS Applied Materials & Interfaces 7 (2015) 24915-24925.
- [16] Labischinski H., Barnickel A., Bradaczek H., Naumann D., Rietschel E.T., Giesbrecht P.: High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of outer membrane. Journal of Bacteriology 162 (1985) 9-20.
- [17] Kunicki-Goldfinger W.J.H.: Życie bakterii, Warszawa: PWN 1998
- [18] Guida A., Towler M.R., Wall J.G., Hill R.G., Eramo S.: Preliminary work on the antibacterial effect of strontium in glass ionomer cements. Journal of Materials Science Letters 22 (2003) 1401-1403.
- [19] Gary A., Roy F.M., Bandyopadhyay A., Bose S.: Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. Acta Biomaterialia 8 (2012) 3144-3152.
- [20] Lima E., Guerra R., Lara V., Guzman A.: Gold nanoparticles as efficient antimicrobial agents for *E.coli* and *Salmonella typhi*. Chemistry Central Journal 7 (2013) 11-17.

**AGH****STUDIA PODYPLOMOWE****Biomateriały – Materiały dla Medycyny****2016/2017**

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208, 210 lub 501 tel. 12 617 44 48, 12 617 23 38, fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl
Kierownik: prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła Sekretarz: dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz	http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/studia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny/
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2016 do 20.10.2016 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (pawilon A3, p. 208, tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (pawilon A3, p. 210, tel. 12 617 23 38, e-mail: krok@agh.edu.pl) mgr inż. Krzysztof Pietryga (pawilon A3, p. 501, tel. 12 617 47 44, pietryga@agh.edu.pl)	
Czas trwania: 2 semestry (od XI 2016 r. do VI 2017 r.) 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu Przewidywana data rozpoczęcia: 19 XI 2016 r.	Opłaty: 2 600 zł