

ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

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

CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

Number 136

Numer 136

Volume XIX

Rok XIX

JULY 2016

LIPIEC 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.

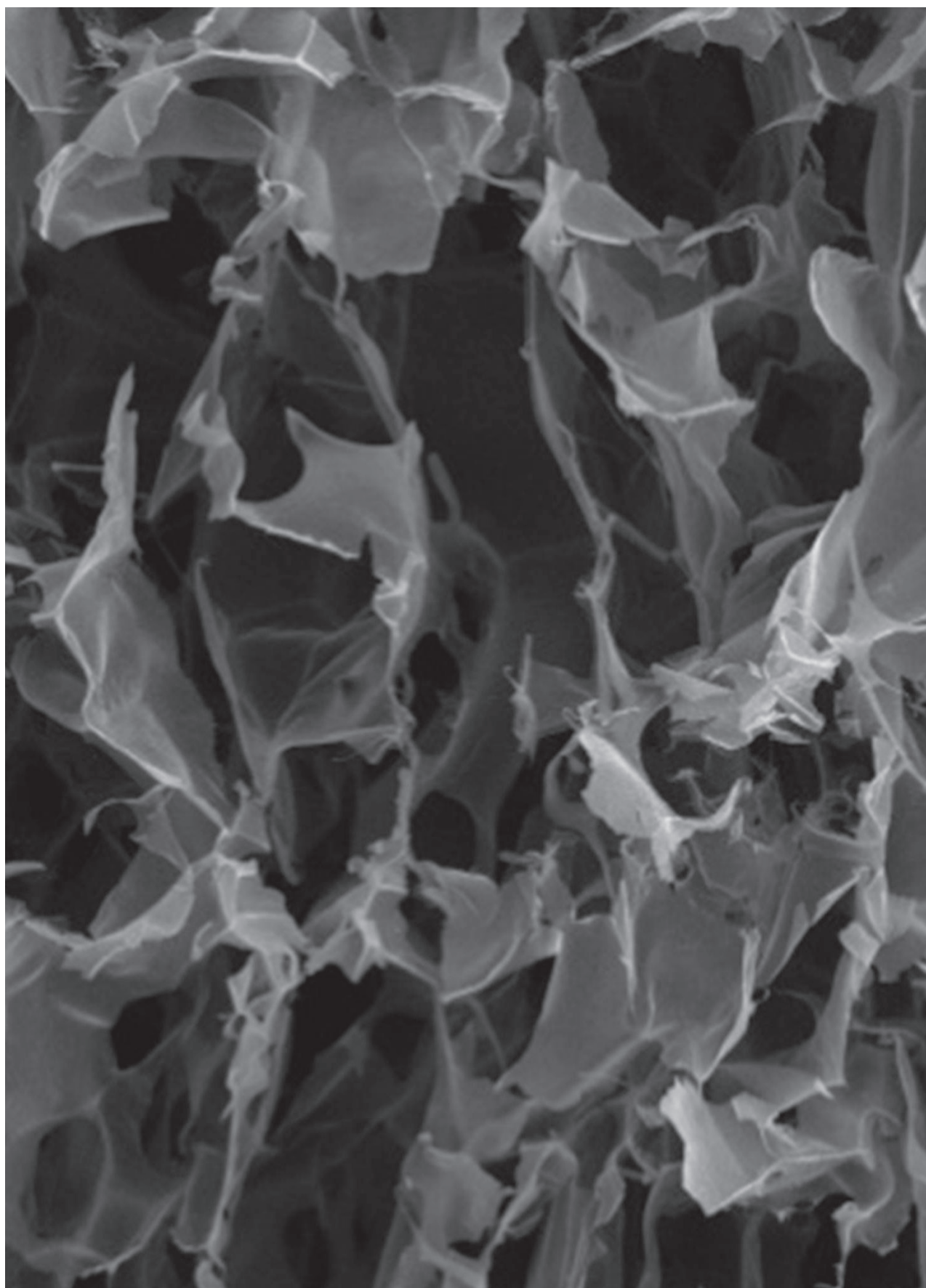
Scientific Publishing

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 - UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA, POLAND

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

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

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

Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA

Jan Ryszard Dąbrowski - BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY, POLAND

Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM

Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM

Matthias Eppe - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY

Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

Ireneusz Kotela - CENTRAL CLINICAL HOSPITAL OF THE MINISTRY OF THE INTERIOR AND ADMINSTR. IN WARSAW, POLAND

Małgorzata Lewandowska-Szumieł - MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

Jan Marciniak - SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, ZABRZE, POLAND

Ion.N. Mihailescu - NATIONAL INSTITUTE FOR LASER, PLASMA AND RADIATION PHYSICS, BUCHAREST, ROMANIA

Sergey Mikhlovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM

Stanisław Mitura - KOSZALIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

Piotr Niedzielski - TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Abhay Pandit - NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY, IRELAND

Stanisław Pielka - WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND

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

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

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

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

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

Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.
4. Struktura artykułu:
 - TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe (4-6) • 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

Prenumerata obejmuje 4 numery regularne i nie obejmuje numeru specjalnego (materiały konferencyjne).

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

Subscription includes 4 issues and does not include special issue (conference materials).

26th Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

12-15 October 2017

www.biomat.agh.edu.pl



SPIS TREŚCI

WPŁYW DODATKU KWAŚÓW KARBOKSYLOWYCH
NA CZAS WIĄZANIA I WYTRZYMAŁOŚĆ NA
ŚCISKANIE CEMENTÓW SZKŁO-JONOMEROWYCHMONIKA BERNAT, LIDIA CIOŁEK,
ZBIGNIEW JAEGERMANN, PAWEŁ PĘCZKOWSKI 2WPŁYW WIELOKROTNEJ STERYLIZACJI
NA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓWDOROTA BOCIĄGA, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI,
ANNA OLEJNIK, LIDIA ŚWIĄTEK, MARTA MARCHWICKA 11OTRZYMYWANIE ORAZ CHARAKTERYSTYKA
SKAFOLDÓW SIECIOWANYCH KWASEM
TANINOWYM NA BAZIE CHITOZANU, KOLAGENU
ORAZ KWASU HIALURONOWEGOBEATA KACZMAREK, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK 21RESORBOWALNE POKRYCIA POLIMEROWE
NA DRUTACH ZE STOPU MAGNEZU
MODYFIKOWANE TCP I ZnOANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK,
OLGA SIKORA, WITOLD RECZYŃSKI,
MAGDALENA RZEWUSKA, JAN CHŁOPEK 28

CONTENTS

EFFECTS OF CARBOXYLIC ACID ADDITION
ON THE SETTING TIME AND COMPRESSIVE
STRENGTH OF GLASS-IONOMER CEMENTSMONIKA BERNAT, LIDIA CIOŁEK,
ZBIGNIEW JAEGERMANN, PAWEŁ PĘCZKOWSKI 2INFLUENCE OF THE MULTIPLE STERILIZATION
PROCESS ON THE BIOMATERIAL PROPERTIESDOROTA BOCIĄGA, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI,
ANNA OLEJNIK, LIDIA ŚWIĄTEK, MARTA MARCHWICKA 11PREPARATION AND CHARACTERIZATION
OF TANNIC ACID CROSS-LINKED SCAFFOLDS
MADE OF CHITOSAN, COLLAGEN
AND HYALURONIC ACIDBEATA KACZMAREK, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK 21RESORBABLE POLYMER COATINGS MODIFIED
WITH TRICALCIUM PHOSPHATE AND ZINC OXIDE
FOR MAGNESIUM ALLOY WIRESANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK,
OLGA SIKORA, WITOLD RECZYŃSKI,
MAGDALENA RZEWUSKA, JAN CHŁOPEK 28

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

WPŁYW DODATKU KWASÓW KARBOKSYLOWYCH NA CZAS WIĄZANIA I WYTRZYMAŁOŚĆ NA ŚCISKANIE CEMENTÓW SZKŁO-JONOMEROWYCH

MONIKA BIERNAT*, LIDIA CIOŁEK, ZBIGNIEW JAEGERMANN, PAWEŁ PĘCZKOWSKI

INSTYTUT CERAMIKI I MATERIAŁÓW BUDOWLANYCH,
ZAKŁAD TECHNOLOGII CERAMIK,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA

*E-MAIL: M.BIERNAT@ICIMB.PL

Streszczenie

Cementy szkło-jonomerowe powstają w czasie utwardzania kompozycji złożonych z dwóch składników: szklanego proszku i płynu wiążącego będącego wodnym roztworem polikwasów alkenowych. Wiązanie cementu polega na reakcji kwasowo-zasadowej, gdy jony pierwiastków metalicznych uwalniane z powierzchni szkła wiążą się z polianionami pochodzącymi z polikwasu. Z uwagi na szybki przebieg tej reakcji do płynu wiążącego dodawane są różne związki, które wydłużają czas wiązania kompozycji. Są to najczęściej hydroksykwasy karboksylowe zdolne do kompleksowania jonów uwalnianych ze szkła.

W pracy przedstawiono wyniki badań dotyczące wpływu dodatku wybranych hydrokсыkwasów karboksylowych (winowego, cytrynowego i jabłkowego) oraz kwasu szczawowego na właściwości kompozycji szkło-jonomerowych. Na potrzeby badań płyny wiążące otrzymywano na podstawie syntezowanego w ICiMB roztworu kopolimeru kwasu akrylowego i itakonowego, wody oraz ww. kwasów karboksylowych. Właściwości kompozycji szkło-jonomerowych otrzymanych na podstawie uzyskanych płynów wiążących określano poprzez pomiar czasu wiązania, a właściwości utwardzonych cementów na podstawie wytrzymałości na ściskanie.

Wyniki badań wskazują, że dodatek hydrokсыkwasów karboksylowych, a zwłaszcza kwasu jabłkowego, powoduje zmniejszenie lepkości płynu wiążącego, wydłużenie czasu wiązania kompozycji szkło-jonomerowej, a także ułatwia zarabianie cementu. Niestety dodatek ten wpływa niekorzystnie na właściwości wytrzymałościowe otrzymywanych cementów, zmniejszając ich wytrzymałość na ściskanie. Dodatek do płynu wiążącego kwasu szczawowego może powodować zmianę przebiegu procesu wiązania kompozycji szkło-jonomerowej. W zależności od rodzaju stosowanych dodatków i ich zawartości procentowej w płynie wiążącym czas wiązania kompozycji może zostać skrócony lub wydłużony nie zmieniając przy tym właściwości wytrzymałościowych cementów.

Uzyskane wyniki badań wykazują, że na przebieg procesu wiązania kompozycji szkło-jonomerowych może mieć wpływ kilka czynników równocześnie, co może być istotne przy projektowaniu materiałów do nowych zastosowań.

Słowa kluczowe: cementy szkło-jonomerowe, czas wiązania, wytrzymałość na ściskanie

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 2-10]

EFFECTS OF CARBOXYLIC ACID ADDITION ON THE SETTING TIME AND COMPRESSIVE STRENGTH OF GLASS-IONOMER CEMENTS

MONIKA BIERNAT*, LIDIA CIOŁEK, ZBIGNIEW JAEGERMANN, PAWEŁ PĘCZKOWSKI

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

*E-MAIL: M.BIERNAT@ICIMB.PL

Abstract

Glass-ionomer cements are created through the curing process of compositions made of two components: glass powder and a bonding liquid - an aqueous solution of polyalkenoic acids. Cement setting is based on an acid-base reaction; when ions of metal elements released from the glass surface bond with polyanions derived from the polyacid. Since the reaction is very fast, various compounds are added to the bonding liquids to extend the composition setting time. These are most often carboxylic hydroxyacids capable of complexing ions released from the glass.

The work presents test results regarding the effects of the addition of selected carboxylic hydroxyacids (tartaric, citric, and malic acid) and oxalic acid on the glass-ionomer composition properties. For the purposes of the study, bonding liquids were obtained on the basis of the solution of acrylic acid-itaconic acid copolymer synthesised in the Institute of Ceramics and Building Materials (ICiMB), water and the above listed carboxylic acids. Properties of the glass-ionomer compositions obtained with the bonding liquids were determined through the setting time measurement, while the properties of the cured cements were determined on the basis of compressive strength.

Test results indicate that addition of carboxylic hydroxyacids, especially malic acid, reduces the bonding liquid viscosity, extends the glass-ionomer composition setting time, and facilitates cement mixing. Unfortunately, this additive has negative influence on the strength of the cements obtained, reducing their compressive strength. The addition of oxalic acid to the bonding liquid may modify the setting process of glass-ionomer composition. Depending on the type of additives and their percentage content in the bonding liquid, the composition setting time may be reduced or extended, without changing the strength properties of the cements.

Test results indicate that there may be several factors that simultaneously affect the glass-ionomer composition setting process, which may be of significance in developing materials for new applications.

Keywords: glass-ionomer cements, setting time, compressive strength

[Engineering of Biomaterials 136 (2016) 2-10]

Wprowadzenie

Cementy szkło-jonomerowe są dobrze znanymi materiałami znajdującymi zastosowanie w stomatologii zachowawczej i protetyce [1-3]. Wykazują wysoką adhezję do szkliwa i zębiny, a w czasie ich utwardzania następuje chemiczne wiązanie z hydroksyapatytem zawartym w tkankach zębowych, co zapewnia szczelność i trwałość wypełnienia. Cementy szkło-jonomerowe charakteryzują się ponadto wysoką wytrzymałością mechaniczną, brakiem skurczu podczas wiązania i niskim współczynnikiem rozszerzalności termicznej. Z uwagi na powyższe zalety stosuje się je również w otolaryngologii, np. do mocowania elementów kostnych, implantów lub rekonstrukcji łańcucha kosteczek słuchowych [4,5], jak również prowadzone są prace nad zastosowaniem cementów szkło-jonomerowych do wytwarzania klejów dla ortopedii [6-8].

Szczególne miejsca i warunki aplikacji materiałów szkło-jonomerowych wymagają spełnienia ściśle określonych wymagań. Bardzo ważna jest możliwość łatwego mieszania (zarabiania) kompozycji, a także odpowiedni czas wiązania i wytrzymałość mechaniczna otrzymanego cementu.

Wiązanie cementu szkło-jonomerowego polega na reakcji kwasowo-zasadowej zachodzącej pomiędzy proszkiem i płynem, na skutek łączenia jonów metali uwalnianych ze szklanego proszku z polianionami pochodzącymi z wodnego roztworu polikwasu alkenowego. Przebieg reakcji w tak prostym systemie składników jest z reguły bardzo szybki i przez to nie spełnia wymagań użytkowych dla materiałów szkło-jonomerowych. Dlatego konieczne jest stosowanie dodatków. Zgodnie z danymi literaturowymi na kinetykę procesu wiązania szkło-jonomerów wpływają związki kompleksujące jony metalu pochodzące z proszku szklanego, np. niektóre hydroksykwasy karboksylowe [9-12].

Najbardziej znanym i powszechnie stosowanym w cementach szkło-jonomerowych dodatkiem jest kwas L(+) winowy. Dane literaturowe wskazują, że kompleksowanie przez kwas L(+) winowy jonów pochodzących ze szkła zachodzi szybciej aniżeli reakcja tych jonów z polianionami pochodzącymi z polikwasu akrylowego, przez co następuje początkowe opóźnienie wiązania cementu [13,14]. Dzięki temu dodatek tego kwasu wpływa na wydłużenie czasu pracy z cementem szkło-jonomerowym, co umożliwia wykonanie różnych działań aplikacyjnych przed całkowitym jego utwardzeniem. Jednocześnie wiadomo, że szybkość kompleksowania nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na kinetykę utwardzania cementów szkło-jonomerowych.

Na podstawie badań przeprowadzonych z udziałem kwasów glikolowego i winowego wykazano, że dużą rolę w przebiegu reakcji wiązania szkło-jonomerów mogą odgrywać też czynniki strukturalne [15]. W obu wymienionych kwasach występują identyczne grupy chelatujące, a jedynie kwas winowy powoduje zwiększenie szybkości utwardzania w końcowym etapie procesu. Crisp i Wilson wskazali iż na otrzymany efekt może mieć wpływ struktura kwasu winowego, która umożliwia tworzenie mostków pomiędzy parą jonów metali [15].

Czynnikiem mającym wpływ na kinetykę wiązania cementów szkło-jonomerowych może być również wartość pH [16]. Szczególnie na początkowym etapie utwardzania niskie pH może wzmacniać efektywność uwalniania jonów z powierzchni szkła i zwiększać szybkość wiązania.

Na przestrzeni wielu lat przebadano bardzo dużą liczbę różnych dodatków mających wpływ na kinetykę utwardzania cementów szkło-jonomerowych np.: hydroksykwasy karboksylowe, kwasy hydroksybenzoesowe, diketony, czy różne związki zasadowe [9]. Nie wszystkie z tych związków nadają się jednak do aplikacji w materiałach posiadających kontakt z ludzkim organizmem.

Introduction

Glass-ionomer cements are common materials used in restorative dentistry and prosthodontics [1-3]. They demonstrate high adhesion to enamel and dentin, whereas during their curing process, chemical bonding with hydroxyapatite present in dental tissues takes place, which ensures tightness and durability of the filling. Moreover, glass-ionomer cements are characterised by high mechanical strength, no setting contraction and low thermal expansion coefficient. Due to the above advantages, they are also used in otolaryngology, e.g. for fixing osseous elements, implants or ossicular chain reconstruction [4,5], as well as there are studies being carried out on the use of glass-ionomer cements to make bone cements [6-8].

Specific places and conditions of applying glass-ionomer materials must comply with strict requirements. Easy composition mixing, as well as proper setting time and mechanical strength of the cement are very important.

Glass-ionomer cement setting involves an acid-base reaction between powder and liquid as a consequence of metal ions released from the glass powder connecting with the polyanions derived from the aqueous solution of polyalkenoic acid. With such a simple system of components, a reaction usually happens very quickly and does not fulfil performance requirements for glass-ionomer materials. Therefore, additives are necessary. According to literature, the kinetics of the glass-ionomer setting process is affected by complexing agents for metal ions derived from the glass powder, e.g. some carboxylic hydroxyacids [9-12].

The most known and commonly used additive in glass-ionomer cements is L(+)-tartaric acid. Literature shows that the complexing of ions released from the glass by means of L(+)-tartaric acid is quicker than the reaction of these ions with polyanions derived from polyacrylic acid. As a result, the cement setting process is initially delayed [13,14]. Therefore, the addition of this acid extends the glass-ionomer handling time, which allows performing various actions related to applying the cement before it is completely cured. At the same time, it is known that the complexing time is not the only factor affecting the kinetics of the glass-ionomer cement curing process.

Tests on glycolic acid and tartaric acid demonstrated that structural factors may also play an important role in the glass-ionomer setting reaction [15]. There are identical chelating groups in both acids, although it is only tartaric acid that accelerates curing in the final stage of the process. Crisp and Wilson showed that what determines the final effect is probably the tartaric acid structure, which allows the forming of bridges between the pair of metal ions [15].

Another factor influencing the kinetics of glass-ionomer cement setting may also be the pH value [16]. Low pH may enhance the effectiveness of releasing ions from the glass surface and accelerate the setting, especially at the beginning of the curing process.

Throughout the many years, the influence on the kinetics of the glass-ionomer cement curing has been studied for a very large number of different additives, such as carboxylic hydroxyacids, hydroxybenzoic acids, diketones, or other alkaline compounds [9]. However, not all of those compounds are suitable to be applied in materials being in contact with human body. Among the safe and non-toxic carboxylic hydroxyacids, the most widely described ones are the previously mentioned tartaric acid and citric acid.

Prentice et al. indicate the potential use of oxalic acid in glass-ionomer materials [16]. It is the strongest organic acid, and therefore it may cause rapid release of metal ions.

Spośród bezpiecznych i nietoksycznych hydroksykwasów karboksylowych najszerszej opisywany jest wspomniany kwas winowy oraz kwas cytrynowy.

Prentice i in. wskazują na potencjalne wykorzystanie w materiałach szkło-jonomerowych kwasu szczawiowego [16]. Jest to najmocniejszy kwas organiczny i z uwagi na to może powodować szybkie uwalnianie jonów metali. Ponadto kwas szczawiowy i jego sole stosuje się w dentystyce jako: środki znieczulające, uszczelniacze i środki do wstępnej obróbki ubytków w celu polepszenia wiązania [17,18]. Można założyć, że również w materiałach szkło-jonomerowych będzie obniżał wrażliwość zębiny na ból i polepszał szczelność wypełnień.

W Zakładzie Technologii Ceramiki ICiMB przeprowadzono badania z udziałem kwasu jabłkowego, który stosowany jest szeroko w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, gdzie pełni rolę regulatora kwasowości. Jest naturalnym kwasem, występuje w wielu ziołach i owocach, jest lepszym zakwaszaczem niż kwas cytrynowy i dobrze rozpuszcza się w wodzie i etanolu. Ponadto ogranicza rozwój bakterii patogennych i chorobotwórczych grzybów [19,20].

Biorąc pod uwagę powyższe informacje, w ramach niniejszej pracy postanowiono zbadać wpływ powszechnie znanych hydroksykwasów di- i trikarboksylowych (winowego, jabłkowego i cytrynowego), w połączeniu z kwasem szczawiowym na właściwości wytrzymałościowe i użytkowe (czas wiązania) wytwarzanego w ICiMB cementu szkło-jonomerowego.

Materiały i metody

Jako podstawowe składniki kompozycji szkło-jonomerowej zastosowano:

- komponent proszkowy cementu do wypełnień i odbudowy G-J CHEMADENT, wytworzony ze szkła wapniowo-fluoroglinokrzemianowego w Zakładzie Technologii Ceramiki ICiMB;
- wodne roztwory kopolimeru kwasu akrylowego i itakonowego (AA-IA), stanowiące podstawę płynów wiążących kompozycji, zsyntezowane w oparciu o opis patentowy „Stomatologiczna kompozycja szkło-jonomerowa” [21] w Zakładzie Technologii Ceramiki ICiMB.

Do badań, jako dodatki do płynów wiążących, wytypowano hydroksykwasy karboksylowe: L(+)-winowy (Avantor) – nazywany dalej w niniejszej pracy winowym, cytrynowy (Avantor) i jabłkowy (Fluka) oraz kwas dikarboksylowy – kwas szczawiowy (Avantor).

Roztwory kopolimeru syntezowano z kwasów akrylowego (AA) (Aldrich) i itakonowego (IA) (Aldrich) w stosunku molowym 4:1, w roztworze wodnym, w atmosferze gazu obojętnego, w obecności inicjatora wolnorodnikowego, a następnie poddawano zateżnieniu do pożądanego stężenia ok. 50% na wyparce obrotowej. Postęp reakcji i przebieg zateżniania określano poprzez badania: współczynnika załamania światła, gęstości i lepkości otrzymywanego płynu. Powyższe badania wykonywano przy zachowaniu stałej temperatury 23,5°C (TABELA 1).

Otrzymane roztwory kopolimeru stanowiły podstawę do wytwarzania płynów wiążących kompozycji szkło-jonomerowych, które uzyskiwano poprzez dodawanie do porcji roztworu kopolimeru określonych ilości hydroksykwasu karboksylowego (TABELA 2). Ze względu na małą rozpuszczalność kwasu szczawiowego w wodzie i w zsyntezowanym roztworze kopolimeru, kwas ten stosowano jako drugi dodatek do wybranych płynów wiążących, poza kwasem winowym lub kwasem jabłkowym. Poza tym w celu zwiększenia rozpuszczalności kwasu szczawiowego badania prowadzono z płynem wiążącym, w którym stężenie roztworu kopolimeru obniżono do 45% (TABELA 3).

Furthermore, oxalic acid and its salts are used in dentistry as: anaesthetics, sealants, and agents for pretreatment of cavities for better bonding [17,18]. It may also be assumed that in glass-ionomer materials, it will reduce dentin sensitivity to pain and improve tightness of fillings.

The Department of Ceramic Technology of ICiMB carried out tests on malic acid, which is widely used in the food and pharmaceutical industries as an acidity regulator. It is a natural acid, it is present in many herbs and fruits; it is a better acidifier than citric acid and it demonstrates good solubility in water and ethanol. Furthermore, it inhibits the growth of pathogenic bacteria and fungi [19,20].

Taking into consideration the above data, this work involved the testing of the influence of commonly known di- and tricarboxylic hydroxyacids (tartaric, malic, and citric) in combination with oxalic acid on the strength and performance (setting time) properties of glass-ionomer cement made in ICiMB.

Materials and Methods

The following base components of glass-ionomer composition were used:

- G-J CHEMADENT powder cement component for dental fillings and restoration made of calcium-fluoroaluminosilicate glass in the Department of Ceramic Technology of ICiMB;
- aqueous solutions of acrylic acid-itaconic acid copolymer (AA-IA), constituting the basis for composition bonding liquids, synthesised in accordance with the patent description “Dental glass-ionomer composition” [21] in the Department of Ceramic Technology of ICiMB.

For testing purposes, the following carboxylic hydroxyacids were selected as additives to the bonding liquids: L(+)-tartaric acid (Avantor) - named further in this article as tartaric acid, citric acid (Avantor), and malic acid (Fluka), as well as dicarboxylic acid - oxalic acid (Avantor).

Copolymer solutions were synthesised from acrylic acid (AA) (Aldrich) and itaconic acid (IA) (Aldrich) with a molar ratio of 4:1, in an aqueous solution, under inert gas atmosphere, in the presence of a radical initiator, and then the solution was condensed to the desired concentration of ca. 50%, using a rotary evaporator. Reaction and condensation progress was determined through the tests of the liquid's index of refraction, density and viscosity. The above tests were performed at a fixed temperature of 23.5°C (TABLE 1).

Copolymer solutions obtained constituted the basis for making bonding liquids for glass-ionomer compositions, which was achieved through the addition of specific amounts of a carboxylic hydroxyacid to a portion of the copolymer solution (TABLE 2). Due to low solubility of oxalic acid in water and in the synthesised copolymer solution, the acid was used as a second additive to selected bonding liquids, apart from tartaric acid or malic acid. What is more, in order to increase oxalic acid solubility, the tests were carried out with the use of a bonding liquid with the copolymer solution concentration reduced to 45% (TABLE 3).

All the glass-ionomer composition samples were made in the same way, in the same conditions determined by PN EN ISO 9917-1 “Dentistry. Water-based cements. Part 1: Powder/liquid acid-base cements.” A weighed-out amount of powder divided into two equal parts and a proper amount of bonding liquid were placed on a glass plate. Quantitative ratio of powder to liquid was 2.4g:1ml. The above proportion was determined on the basis of the type of a powder component used. One of the half portions of powder was added to the whole portion of the liquid and mixed for 30 s.

TABELA 1. Właściwości fizykochemiczne zsyntezowanego 50% roztworu kopolimeru kwasu akrylowego i kwasu itakonowego.

TABLE 1. Physicochemical properties of the synthesised 50% acrylic acid-itaconic acid copolymer solution.

Kolor Colour	Zapach Odour	Współczynnik załamania światła Index of refraction*	Gęstość Density [g/cm ³]**	Lepkość Viscosity [mPas]***
bezbarny do słomkowego colourless to straw colour	niewyczuwalny zapach kwasu akrylowego imperceptible smell of acrylic acid	1.427	1.2359	6969

* Współczynnik załamania światła określano przy użyciu refraktometru typu RL3 Polskich Zakładów Optycznych / Index of refraction was determined with a RL3 type refractometer of Polish Optical Industries

** Gęstość określano gęstościomierzem przepływowym Mettler Toledo / Density was determined with a Mettler Toledo flow density meter

*** Lepkość oznaczano przy użyciu reometru rotacyjnego RVDVIII+ Brookfield / Viscosity was determined with the use of an RVDVIII+ Brookfield rotary rheometer

TABELA 2. Skład procentowy płynów wiążących sporządzonych z 50% roztworu kopolimeru AA-IA z dodatkiem kwasów karboksylowych.

TABLE 2. Percent composition of bonding liquids made of 50% AA-IA copolymer solution with added carboxylic hydroxyacids.

Płyn wiążący Bonding liquid	Rodzaj i zawartość hydroksykwasu karboksylowego w płynie wiążącym Type and content of carboxylic hydroxyacid in bonding liquid [%]	Zawartość 50% roztworu kopolimeru AA-IA w płynie wiązącym Content of 50% AA-IA copolymer solution in bonding liquid [%]
1 a	Kwas winowy Tartaric acid	5
1b		10
1c		15
1d		20
2a	Kwas cytrynowy Citric acid	5
2b		10
2c		15
2d		20
3a	Kwas jabłkowy Malic acid	5
3b		10
3c		15
3d		20

Wszystkie próbki kompozycji szkło-jonomerowych sporządzano w taki sam sposób, zachowując warunki określone przez normę PN EN ISO 9917-1 „Stomatologia. Cementy wiążące z udziałem wody. Część 1: Cementy kwasowo-zasadowe w postaci proszku i płynu”. Na płytce szklanej umieszczano odważoną ilość proszku podzieloną na dwie równe części oraz odpowiednią ilość płynu wiążącego. Stosunek ilościowy proszku do płynu wynosił 2,4 g : 1 ml. Powyższa proporcja wynikała z rodzaju zastosowanego komponentu proszkowego. Do całej ilości płynu wprowadzono połowę proszku i mieszano przez 30 s. Następnie dodano pozostały proszek i mieszano do uzyskania jednolitej masy przez następne 30 s. Dla sporządzonych kompozycji szkło-jonomerowych oznaczano czas wiązania. Z tak przygotowanych kompozycji formowano próbki do badań i dla utwardzonych cementów wyznaczano wytrzymałość na ściskanie po 24 h.

TABELA 3. Skład procentowy płynów wiążących sporządzonych z 45% roztworu kopolimeru AA-IA z dodatkiem kwasu szczawowego i wybranych kwasów karboksylowych.

TABLE 3. Percent composition of bonding liquids made of 45% AA-IA copolymer solution with added oxalic acid and selected carboxylic hydroxyacids.

Płyn wiążący Bonding liquid	Zawartość / Content [%]			
	45% roztwór kopolimeru AA-IA 45% AA-IA copolymer solution	kwas winowy tartaric acid	kwas jabłkowy malic acid	kwas szczawowy oxalic acid
4a	90	10	-	-
4b	89.5	10	-	0.5
4c	89	10	-	1
4d	88	10	-	2
4e	87	10	-	3
4f	86	10	-	4
5a	90	-	10	-
5b	89.5	-	10	0.5
5c	89	-	10	1
5d	88	-	10	2
5e	87	-	10	3
5f	86	-	10	4

Then, the remaining powder was added and mixed for another 30 s until a homogeneous mass was obtained. Setting time was determined for the glass-ionomer compositions prepared. Test samples were taken from such prepared compositions and the compressive strength of cured cements was determined after 24 h.

Setting time

Setting time of glass-ionomer compositions was determined at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ with the use of a penetrometer with a mass of 400 ± 5 g with a blunt-tip needle 1 mm in diameter. After a mould was filled with the material in a plastic state, the test was performed by lowering the penetrometer tip vertically to the surface of the material in ten-second intervals, with the tip touching the material for 5 s. The time that passed from the end of the mixing of the composition to the point when the needle no longer left any circular imprints on the material surface visible with double zoom - is considered the setting time.

Czas wiązania

Czas wiązania kompozycji szkło-jonomerowych określano w temperaturze $37 \pm 1^\circ\text{C}$ przy pomocy penetrometru o masie 400 ± 5 g zakończonego igłą z płaską końcówką o średnicy 1 mm. Po napełnieniu formy materiałem w stanie plastycznym przeprowadzano badanie poprzez opuszczenie końcówki penetrometru pionowo na jego powierzchnię w odstępach dziesięciosekundowych i pozostawianie jej przez 5 s. Za czas wiązania przyjęto czas, jaki upłynął od końca mieszania kompozycji do momentu, gdy opuszczona igła nie pozostawiała kolistych śladów na powierzchni, widocznych przy dwukrotnym powiększeniu.

Wytrzymałość na ściskanie

Z każdej kompozycji przygotowano po pięć próbek cementów szkło-jonomerowych w kształcie walców. Tuż po zakończeniu mieszania, badanymi kompozycjami w stanie plastycznym wypełniano formy ze stali nierdzewnej, otrzymując próbki o średnicy 4 mm i wysokości 6 mm. Po upływie 1 godziny próbki szlifowano, wyjmowano z form, zanurzano w wodzie i przechowywano przez 24 godziny w cieplarni utrzymującej temperaturę $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Parametry wytrzymałościowe utwardzonych kompozycji określono z wykorzystaniem maszyny wytrzymałościowej LR 10K produkcji Lloyd Instruments, o maksymalnym obciążeniu 10 kN i szybkości posuwu głowicy 0,7 mm/min. Wartości wytrzymałości na ściskanie obliczane były przez program komputerowy na podstawie wprowadzonych wymiarów próbek i zmierzonego obciążenia maksymalnego.

Dla uzyskanych wyników wytrzymałości na ściskanie sporządzono analizę statystyczną przy pomocy pakietu statystycznego SPSS ver. 23 (Statistical Package for the Social Sciences) określając za pomocą testu t-Studenta statystycznie istotne różnice (p) pomiędzy niezależnymi grupami próbek.

Wyniki i dyskusja

Utworzenie kompozycji szkło-jonomerowej z udziałem zsyntezowanego roztworu kopolimeru AA-IA może sprawiać problemy ze względu na jego wysoką lepkość i szybkie wiązanie kompozycji. Dodanie wytypowanych hydroksy-kwasów karboksylowych obniżyło lepkość wyjściowego roztworu kopolimeru, a czas wiązania kompozycji został wydłużony powyżej 1,5 minuty, tj. minimum określonego dla tego typu cementów w normie PN-EN ISO 9917-1. Z przeprowadzonych badań wynika, że najsilniejszy spadek lepkości roztworu kopolimeru następował przy dodatku kwasu jabłkowego (płyny wiążące 3a–3d), z którego udziałem zarabianie kompozycji szkło-jonomerowej przebiegało najłatwiej (RYS. 1).

Czas wiązania kompozycji wzrastał najsilniej również w przypadku dodatku kwasu jabłkowego do płynów wiążących. Już 10% zawartość tego kwasu powodowała wzrost czasu wiązania do ponad 3 minut (płyn 3b), a dodatek 20% (płyn 3d) skutkował wzrostem czasu wiązania przekraczającym 4 min. Dla kompozycji zawierających płyny wiążące z kwasem winowym czas wiązania wzrastał najwolniej wraz ze wzrostem zawartości kwasu, uzyskując w efekcie wartość niemal o 40% niższą niż kompozycje zawierające płyny z kwasem jabłkowym. Wartości czasów wiązania dla kompozycji zawierających płyny z kwasem cytrynowym znajdowały się pomiędzy wartościami czasów wiązania kompozycji z kwasem winowym i jabłkowym. Utworzenie kompozycji zawierającej kwas cytrynowy było możliwe dopiero przy 10% dodatku tego kwasu (płyn 2b) (RYS. 2).

Compressive strength

Five glass-ionomer cement cylindrical samples were taken from each composition. Upon finishing the mixing process, stainless steel moulds were filled with the tested compositions in a plastic state, thus obtaining samples with a diameter of 4 mm and a height of 6 mm. After 1 h, the samples were sanded, taken out of moulds, immersed in water and stored for 24 h in an incubator set to a fixed temperature of $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Strength parameters of the cured compositions were determined with the use of a testing machine LR 10K produced by Lloyd Instruments with a maximum load of 10 kN and a head travel speed of 0.7 mm/min. Compressive strength values were calculated by a computer program based on the sample dimensions and the maximum load measured.

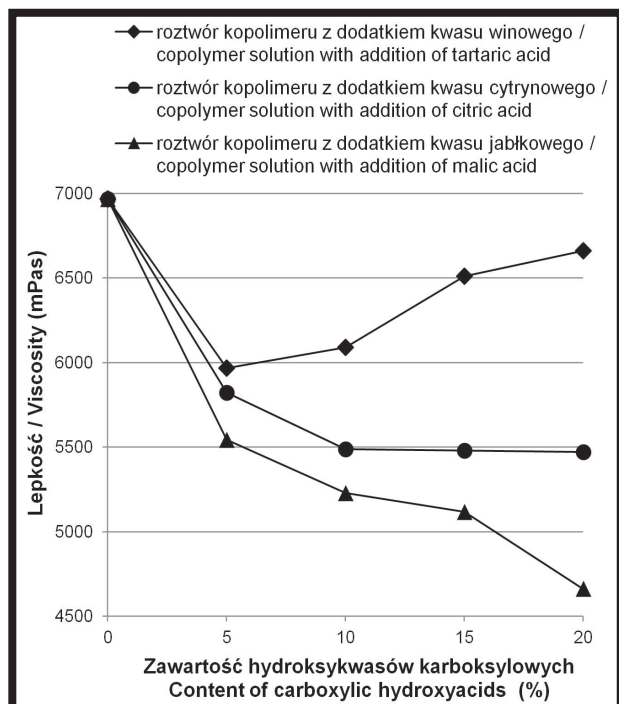
Statistical analysis for the obtained results of compressive strength was made using statistical packed SPSS ver. 23 (Statistical Package for the Social Sciences) and statistically significant differences (p-value) for two independent groups of samples were evaluated by t-Student test.

Results and Discussions

Glass-ionomer composition may be difficult to make with the synthesised AA-IA copolymer solutions, due to its high viscosity and a short setting time of the composition. The addition of the selected carboxylic hydroxyacids reduced the viscosity of the output copolymer solution, extending the composition setting time to more than 1.5 minutes, i.e. the minimum requirement specified for this type of cements in PN-EN ISO 9917-1. The tests performed indicate that the highest reduction in viscosity occurred after the addition of malic acid (bonding liquids 3a–3d), which resulted in the easiest mixing of the glass-ionomer composition (FIG. 1).

The highest increase in the composition setting time was also observed for the addition of malic acid to the bonding liquids. As low as 10% content of this acid already caused the setting time to increase to more than 3 min (liquid 3b), while the addition of 20% (liquid 3d) resulted in the increase of the setting time of more than 4 min. In compositions containing bonding liquids with tartaric acid, the increase in acid content caused the slowest increase in the setting time which the resulting value was almost 40% lower than in compositions containing liquids with malic acid. Setting time values for compositions containing liquids with citric acid fell between the setting time values for compositions with tartaric acid and malic acid. It was not possible to prepare a composition with citric acid until 10% addition of this acid was reached (liquid 2b) (FIG. 2).

Through reducing the bonding liquids viscosity and extending the setting time, the addition of low molecular carboxylic hydroxyacids had positive influence on the easier mixing of the glass-ionomer compositions. Unfortunately, this additive had negative influence on the strength of the cements obtained (TABLE 4). Test results showed that cements containing bonding liquids 3a and 3b with added malic acid of 5% and 10% demonstrated the highest compressive strength. However, the higher content of this acid in a bonding liquid caused the higher reduction in cement strength to values below 100 MPa, which does not meet the requirements of PN-EN ISO 9917-1. Statistically significant differences were observed between the compressive strength values for the cements based on liquids 3a and 3b ($p=0.037$). Statistically significant differences were also observed between the remaining compressive strength values for the cements containing malic acid ($p<0.001$).



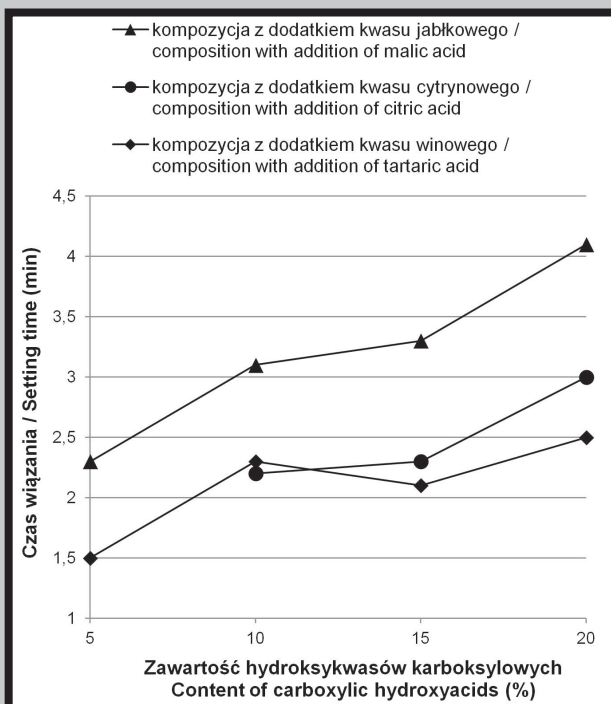
RYS. 1. Lepkość płynów wiążących w zależności od rodzaju i zawartości hydroksykwasów karboksylowych.

FIG. 1. Bonding liquid viscosity depending on the type and content of carboxylic hydroxyacids.

Poprzez obniżenie lepkości płynów wiążących i wydłużenie czasu wiązania, dodatek małych cząsteczkowych hydroksykwasów karboksylowych wpływał korzystnie na możliwość łatwego zarobienia kompozycji szkło-jonomerowych. Niestety dodatek ten wpływał niekorzystnie na właściwości wytrzymałościowe otrzymywanych cementów (TABELA 4). Wyniki badań wykazały, że najwyższą wytrzymałość na ściskanie posiadają cementy zawierające płyny wiążące 3a i 3b z dodatkiem kwasu jabłkowego w ilości 5% i 10%. Natomiast dalsze podnoszenie zawartości tego kwasu w płynie wiążącym powoduje znaczny spadek wytrzymałości cementów do wartości poniżej 100 MPa, co nie spełnia wymagań normy PN-EN ISO 9917-1. Pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie dla cementów na bazie płynów 3a i 3b stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p=0,037$). Również pomiędzy resztą wartości wytrzymałości na ściskanie dla cementów zawierających kwas jabłkowy stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p<0,001$).

Najbardziej stabilnymi wartościami wytrzymałości na ściskanie (powyżej 100 MPa) charakteryzowały się cementy na podstawie płynów wiążących 1a – 1d, zawierające kwas winowy. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie dla cementów zawierających płyny 1a i 1b, z dodatkiem kwasu winowego w ilości 5% i 10%. Pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie dla cementów na bazie płynów 1b i 1d stwierdzono istotne statystycznie różnice ($p<0,001$). Wykazano także istotne statystycznie różnice ($p<0,05$) pomiędzy resztą wartości wytrzymałości na ściskanie dla cementów zawierających kwas winowy.

Wartości wytrzymałości na ściskanie dla cementów zawierających płyny z kwasem cytrynowym znajdowały się pomiędzy wartościami wytrzymałości dla cementów z dodatkiem kwasu winowego i jabłkowego. Stwierdzono istotne statystycznie różnice pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie dla cementów na bazie płynów 2a i 2c oraz 2b i 2c ($p<0,001$).



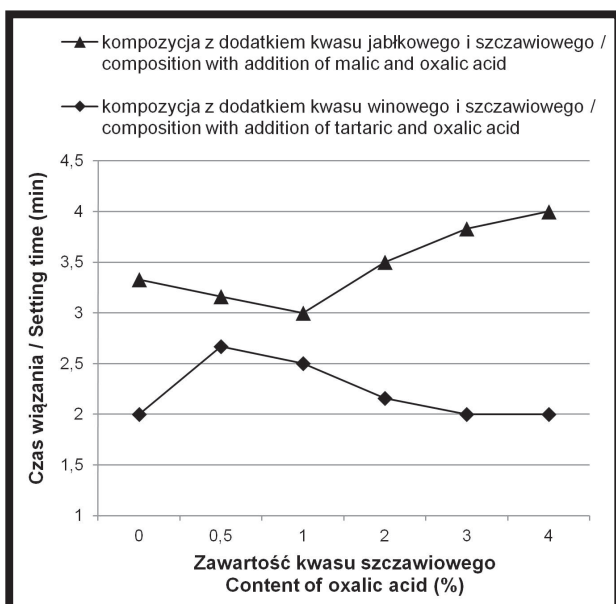
RYS. 2. Czas wiązania kompozycji szkło-jonomerowych w zależności od rodzaju i zawartości hydroksykwasów karboksylowych.

FIG. 2. Glass-ionomer composition setting time depending on the type and content of carboxylic hydroxyacids.

TABELA 4. Wytrzymałości na ściskanie cementów szkło-jonomerowych w zależności od rodzaju i zawartości hydroksykwasów karboksylowych w płynach wiążących.

TABLE 4. Glass-ionomer cement compressive strengths depending on the type and content of carboxylic hydroxyacids in the bonding liquids.

Płyn wiążący Bonding liquid	Rodzaj i zawartość hydroksykwasu karboksylowego w płynie wiążącym Type and content of carboxylic hydroxyacid in bonding liquid [%]	Wytrzymałość na ściskanie (odchylenie standardowe) Compressive strengths (standard deviation) [MPa]
1a	Kwas winowy Tartaric acid	5
1b		10
1c		15
1d		20
2a	Kwas cytrynowy Citric acid	10
2b		15
2c		20
3a	Kwas jabłkowy Malic acid	5
3b		10
3c		15
3d		20



RYS. 3. Czas wiązania kompozycji szkło-jonomerowych w zależności od zawartości kwasu szczawowego.

FIG. 3. Glass-ionomer composition setting time depending on the content of oxalic acid.

Rolę modyfikatora przebiegu reakcji wiązania w kompozycjach szkło-jonomerowych może odgrywać kwas szczawowy. Jak wykazali Prentice i in. [16] może on wpływać na czas wiązania nie zmieniając właściwości wytrzymałościowych.

Biorąc pod uwagę najwyższe wartości czasów wiązania dla kompozycji z udziałem kwasu jabłkowego oraz największą stabilność wartości wytrzymałości na ściskanie dla cementów z udziałem kwasu winowego, do dalszych badań wytypowano płyny wiążące o zawartości wspomnianych kwasów równej 10% i niskich zawartościach kwasu szczawowego: od 0,5% do 4% (TABELA 3).

Badania wykazały, że małe dodatki kwasu szczawowego (0,5% wag. i 1% wag.) wpływają na czasy wiązania utworzonych kompozycji w różny sposób (RYS. 3). Dla kompozycji zawierających płyn wiążący z kwasem winowym czas wiązania wzrasta najbardziej po dodaniu kwasu szczawowego w ilości 0,5% wag. (płyn 4b). Mniejszy wzrost czasu wiązania zaobserwowano dla dodatku kwasu szczawowego w ilości 1% wag. i 2% wag. (płyn 4c i 4d). Dalszy dodatek kwasu szczawowego nie wydłuża czasu wiązania kompozycji.

Natomiast dla kompozycji utworzonych na podstawie płynów z dodatkiem kwasu jabłkowego czas wiązania maleje po dodaniu kwasu szczawowego w ilościach 0,5% wag. (płyn 5b) i 1% wag. (płyn 5c). Większy dodatek kwasu szczawowego powoduje wzrost czasu wiązania.

Otrzymane wyniki wykazują, że na przebieg wiązania kompozycji szkło-jonomerowych ma wpływ wiele czynników równocześnie. Niektóre z nich mogą oddziaływać synergicznie, a inne znoszą się wzajemnie. Efekt skrócenia czasu wiązania przez dodatek kwasu szczawowego może wynikać z obniżenia pH układu i szybszego uwalniania jonów metali z powierzchni szkła. Niemniej jednak możliwe jest również szybkie tworzenie się nierozpuszczalnych soli szczawianowych z uwalnianych ze szkła jonów. Odmienne wyniki czasów wiązania dla kompozycji zawierających kwas winowy i jabłkowy świadczą też o tym, że duży wpływ mogą mieć czynniki strukturalne wpływające na łatwość kompleksowania uwalnianych jonów.

The cements based on bonding liquids 1a–1d containing tartaric acid were characterised by the most stable compressive strength values (more than 100 MPa). No statistically significant differences were observed between the compressive strength values for the cements containing liquids 1a and 1b with added tartaric acid of 5% and 10%. Statistically significant differences were observed between the compressive strength values for the cements based on liquids 1b and 1d ($p < 0.001$). Statistically significant differences were also demonstrated between the remaining compressive strength values for the cements containing tartaric acid ($p < 0.05$).

Compressive strength values for cements containing liquids with citric acid fell between the compressive strength values for cements with tartaric acid and malic acid. Statistically significant differences were demonstrated between the compressive strength values for the cements based on liquids 2a and 2c, as well as between 2b and 2c ($p < 0.001$).

Oxalic acid may function in glass-ionomer compositions as a setting reaction modifier. As demonstrated by Prentice et al. [16], it may affect the setting time without affecting the strength properties.

With respect to the highest setting time values for compositions with malic acid and the highest stability of the compressive strength values for cements with tartaric acid - bonding liquids with a content of the above acids amounting to 10% and a low content of oxalic acid ranging from 0.5% to 4% were selected for further studies.

Tests demonstrated that small additions of oxalic acids (0.5 wt% and 1 wt%) affect the setting time values of the compositions differently (FIG. 3). For compositions containing liquid with tartaric acid, the setting time increases most after adding 0.5 wt% of oxalic acid (liquid 4b). Lower increase of the setting time was observed for the addition of 1 wt% and 2 wt% of oxalic acid (liquids 4c and 4d). If more oxalic acid is added, the setting time is not extended.

However, for compositions based on liquids with malic acid, the setting time is reduced after the addition of 0.5 wt% (liquid 5b) and 1 wt% (liquid 5c) of oxalic acid. However, if more oxalic acid is added, the setting time is extended.

Results indicate that glass-ionomer composition setting depends on many factors at a time. Some of them may have synergic effect, others neutralise one another. The effect of reducing the setting time after the addition of oxalic acid may stem from a lower pH of the system and faster release of metal ions from the glass surface. Nevertheless, it is also possible that insoluble oxalic salts are formed from the ions released from glass. Different results of the setting times for the compositions containing tartaric acid and malic acid also suggest that structural factors may have considerable influence, as they facilitate released ions complexing.

Strength test results of cements based on bonding liquids containing oxalic acid does not demonstrate a considerable influence of oxalic acid on the compressive strength of cements that contain it (TABLE 5). For cements containing liquids with malic acid and oxalic acid, no statistically significant differences were observed between the compressive strength values. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were demonstrated between the compressive strength values for some cements based on liquids containing tartaric acid and oxalic acid: 4e and 4a ($p = 0.034$), 4e and 4b ($p = 0.029$), 4e and 4d ($p = 0.031$), 4f and 4a ($p = 0.019$), 4f and 4b ($p = 0.016$), 4f and 4d ($p = 0.017$).

Test results confirm the hypothesis proposed by Prentice et al. [16] that poorly soluble particles of precipitated oxalic salts are likely to stay strongly embedded in the glass-ionomer cement network, not affecting its strength properties. Due to their sufficiently low sizes, oxalates may serve as a filler that influences the high strength of cement matrix.

TABELA 5. Wytrzymałości na ściskanie cementów szkło-jonomerowych w zależności od zawartości kwasu szczawiowego w płynach wiążących.

TABLE 5. Glass-ionomer cement compressive strengths depending on the content of oxalic acid in the bonding liquids.

Płyn wiążący Bonding liquid	Rodzaj i zawartość hydroksykwasu karboksylowego w płynie wiążącym Type and content of carboxylic hydroxyacid in bonding liquid [%]	Zawartość kwasu szczawiowego w płynie wiążącym Content of oxalic acid in bonding liquid [%]	Wytrzymałość na ściskanie (odchylenie standardowe) Compressive strengths (standard deviation) [MPa]
4a	Kwas winowy Tartaric acid	10	-
4b			107.2 (5.46)
4c			0.5
4d			121.0 (6.53)
4e			1
4f			115.4 (3.12)
5a	Kwas jabłkowy Malic acid	10	2
5b			123.3 (8.56)
5c			3
5d			111.3 (4.41)
5e			4
5f			111.3 (2.65)
5a	Kwas jabłkowy Malic acid	10	-
5b			102.7 (3.62)
5c			0.5
5d			109.8 (7.91)
5e			1
5f			108.2 (9.18)
5a	Kwas jabłkowy Malic acid	10	2
5b			105.6 (6.99)
5c			3
5d			107.2 (5.46)
5e			4
5f			101.0 (4.78)

Wyniki badań wytrzymałościowych dla cementów otrzymanych na bazie płynów wiążących zawierających kwas szczawiowy nie wykazują znaczącego wpływu zawartości kwasu szczawiowego na wytrzymałość na ściskanie cementów z jego udziałem (TABELA 5). Dla cementów zawierających płyny z kwasem jabłkowym i kwasem szczawiowym nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie. Istotne statystycznie różnice ($p < 0,05$) wykazano pomiędzy wartościami wytrzymałości na ściskanie dla niektórych cementów na bazie płynów zawierających kwas winowy i kwas szczawiowy: 4e i 4a ($p = 0,034$), 4e i 4b ($p = 0,029$), 4e i 4d ($p = 0,031$), 4f i 4a ($p = 0,019$), 4f i 4b ($p = 0,016$), 4f i 4d ($p = 0,017$).

Wyniki badań potwierdzają hipotezę Prentice'a i in. [16], że słabo rozpuszczalne cząstki wytrąconych soli szczawianowych prawdopodobnie pozostają silnie wbudowane w sieć cementu szkło-jonomerowego nie zmieniając jego właściwości wytrzymałościowych. Wystarczająco małe rozmiary szczawianów sprawiają, że mogą one pełnić rolę wypełniacza wpływającego na wysoką wytrzymałość matrycy cementu.

Wnioski

Wpływ dodatku hydroksykwasów karboksylowych na reakcję wiązania kompozycji szkło-jonomerowej opiera się głównie na zdolności do kompleksowania jonów pierwiastków metalicznych uwalnianych z powierzchni proszku szklanego, co powoduje początkowe opóźnienie wiązania cementu. Spośród rozpatrywanych hydroksykwasów karboksylowych na wydłużenie czasu wiązania kompozycji szkło-jonomerowej wytwarzanej w ICiMB w największym stopniu wpływał kwas jabłkowy. 10% dodatek kwasu jabłkowego do płynu wiążącego pozwalał również na uzyskanie cementu o wytrzymałości na ściskanie przewyższającej 100 MPa.

Conclusions

The effects of the carboxylic hydroxyacids addition on the glass-ionomer composition setting is mainly based on the ability to form complexes with ions of metal elements released from the glass powder surface, what initially delays the cement setting. Among the carboxylic hydroxyacids considered, malic acid had the strongest influence on the extension of the setting time of the glass-ionomer composition made in ICiMB. With 10% addition of malic acid to the bonding liquid, the cement obtained was characterised by a compressive strength higher than 100 MPa.

Other factors, such as the pH value of the system or structural factors, may also affect the glass-ionomer composition setting process and the easiness of ion complexing. Tests on the bonding liquids containing oxalic acid demonstrated that the addition of this acid may accelerate or inhibit the setting process depending on its content and composition components. At the same time, the addition of this acid does not cause significant changes in the compressive strength values of the cements obtained. Through the appropriate selection of carboxylic acid additives, we may obtain glass-ionomer compositions with desired properties to meet different user requirements.

Na przebieg wiązania kompozycji szkło-jonomerowych oraz na łatwość kompleksowania jonów mogą mieć wpływ również inne czynniki, jak pH układu czy czynniki strukturalne. Na podstawie badań z udziałem płynów wiążących zawierających kwas szczawiowy wykazano, że dodatek tego kwasu może w zależności od jego zawartości oraz od składu kompozycji powodować przyspieszenie lub spowolnienie jej wiązania. Jednocześnie dodatek tego kwasu nie powoduje znaczących zmian wytrzymałości na ściskanie uzyskanych cementów. Poprzez odpowiedni dobór dodatków kwasów karboksylowych można otrzymywać kompozycje szkło-jonomerowe o pożądanych właściwościach spełniających różne wymagania aplikacyjne.

Podziękowania

Praca była finansowana ze środków na działalność statutową Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Autorzy składają serdeczne podziękowania Pani Marii Bobrowskiej za okazaną pomoc w trakcie powstawania publikacji.

Acknowledgments

The work was financed from resources assigned to the statutory activity of the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw.

The authors would like to thank Ms. Maria Bobrowska for support during the work on this publication.

Piśmiennictwo

- [1] Karaś J.: Materiały stosowane do odbudowy twardych tkanek zębowych – część I. Szkło i Ceramika 4 (2006) 9-13.
- [2] Karaś J.: Materiały stosowane do odbudowy twardych tkanek zębowych – część II. Szkło i Ceramika 5 (2006) 28-32.
- [3] Wilson A.D., McLean J.W.: Glass ionomer cement. Quintessence Publishing Co, Chicago, IL, USA (1988).
- [4] Karaś J., Floriańczyk T., Ciolek L., Jaegermann Z.: Materiały szkło-jonomerowe dla otocirurgii. Szkło i Ceramika 1 (2006) 8-13.
- [5] Ramsden R.T., Herdman R.C.T., Lye R.H.: Ionomeric bone cement in otoneurological surgery. Journal of Laryngology and Otology 106 (1992) 949-953.
- [6] Hatton P.V., Hurrell-Gillingham K., Brook I.M.: Biocompatibility of glass-ionomer bone cements. Journal of Dentistry 34 (2006) 598-601.
- [7] Brook I.M., Hatton P.V.: Glass-ionomers: bioactive implant materials. Biomaterials 19 (1998) 565-571.
- [8] Jonck L.M., Grobbelaar C.J., Strating H.: The biocompatibility of glass-ionomer cement in joint replacement-bulk testing. Clinical Materials 4 (1989) 85-107.
- [9] Wilson A.D., Crisp S., Ferner A.J.: Reactions in glass-ionomer cements: IV. Effect of chelating comonomers on setting behavior. Journal of Dental Research 55 (1976) 489-495.
- [10] Cook W.D.: Dental polyelectrolyte cements. III. Effect of additives on their rheology. Biomaterials 4 (1983) 85-88.
- [11] Cook W.D.: Setting of dental polyelectrolyte cements-viscosity studies of model systems. Journal of Biomedical Materials Research 17 (1983) 283-291.
- [12] Hill R.G., Wilson A.D.: A rheological study of the role of additives on the setting of glass-ionomer cements. Journal of Dental Research 67 (1988) 1446-1450.

References

- [13] Prosser H.J., Jerome S.M., Wilson A.D.: The effect of additives on the setting properties of a glass-ionomer cement. Journal of Dental Research 61 (1982) 1195-1198.
- [14] Crisp S., Ferner A.J., Lewis B.G., Wilson A.D.: Properties of improved glass ionomer cement formulations. Journal of Dentistry 3 (1975) 125-130.
- [15] Crisp S., Wilson A.D.: Reactions in glass-ionomer cements: V. Effect of incorporating tartaric acid in the cement liquid. Journal of Dental Research 55 (1976) 1023-31.
- [16] Prentice L.H., Tyas M., Burrow M.F.: The effect of oxalic acid incorporation on the setting time and strength of a glass-ionomer cement. Acta Biomaterialia 2 (2006) 109-112.
- [17] Gillam D.G., Mordan N.J., Sinodinou A.D., Tang J.Y., Knowles J.C., Gibson I.R.: The effects of oxalate-containing products on the exposed dentine surface: an SEM investigation. Journal of Oral Rehabilitation 28 (2001) 1037-1044.
- [18] Pashley D.H., Carvalho R.M., Pereira J.C., Villanueva R., Tay F.R.: The use of oxalate to reduce dentin permeability under adhesive restorations. American Journal of Dentistry 14 (2001) 89-94.
- [19] Massilia R.M., Melgar M.J., Belloso M.O.: Antimicrobial activity of malic acid against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple, pear and melon juices. Food Control. 20 (2009) 105-112.
- [20] Almasoud A., Hettiarachchy N., Rayaprolu S., Babu D., Min Kwon Y., Mauromoustakos A.: Inhibitory effects of lactic and malic organic acids on autoinducer type 2 (AI-2) quorum sensing of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. LWT Food Science and Technology 66 (2016) 560-564.
- [21] Karaś J., Floriańczyk T., Polesiński Z.: Stomatologiczna kompozycja szkło-jonomerowa. Opis patentowy PL 188324 (2005).

WPŁYW WIELOKROTNEJ STERYLIZACJI NA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓW

DOROTA BOCIĄGA*, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA OLEJNIK,
LIDIA ŚWIĄTEK, MARTA MARCHWICKA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MATERIAŁÓW FUNKCYJNALNYCH
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ
*E-MAIL: DOROTA.BOCIĄGA@P.LODZ.PL

Streszczenie

Materiały metaliczne, między innymi stopy tytanu posiadają liczne właściwości, które pozwalają na ich częste stosowanie do produkcji wyrobów biomedycznych. Wszystkie urządzenia przeznaczone do celów medycznych przed użyciem muszą przejść proces sterylizacji. W praktyce niektóre z nich mogą być poddane więcej niż jednemu cyklowi sterylizacji przed umieszczeniem w ciele pacjenta. Pomimo tego, że sterylizacja jest jednym ze standardowych procesów, któremu podlegają wszystkie implanty, może być ona przyczyną zmian właściwości powierzchniowych materiału. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, jak proces wielokrotnej sterylizacji wpływa na właściwości powierzchniowe oraz odpowiedź komórkową dla grupy próbek wykonanych z dwóch stopów tytanu: Ti6Al4V i Ti6Al7Nb. Wypolerowane próbki obu stopów zostały poddane jednemu, pięciu oraz dziesięciu cyklom sterylizacji parowej. Próbki zostały przebadane pod kątem morfologii powierzchni (SEM) oraz składu chemicznego (EDS), a także topografii powierzchni (profilometr) oraz zwilżalności (pomiar kąta zwilżania metodą kropli). Badania cytotoksyczności i proliferacji komórek zostały przeprowadzone poprzez wykonanie testu live/dead z wykorzystaniem komórek kościotwórczych linii Saos-2. Przeprowadzone badania dowodzą, że wielokrotna sterylizacja powoduje pojawianie się zanieczyszczeń na powierzchni materiału oraz zwiększenie grubości warstwy tlenkowej. Wartości energii powierzchniowej oraz parametrów chropowatości wzrosły wraz ze wzrostem liczby cykli sterylizacji. Proliferacja komórek na wysterylizowanych próbkach ze stopów tytanu była mniejsza niż w przypadku stali nierdzewnej oraz próbki kontrolnej, chociaż żadna z próbek nie wykazała cytotoksyczności. Porównując dwa przebadane stopy tytanu, mniejsza proliferacja została odnotowana na próbkach Ti6Al7Nb.

Słowa kluczowe: Ti6Al4V, Ti6Al7Nb, wielokrotna sterylizacja, chropowatość powierzchni, zwilżalność, biouzgodność

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 11-20]

INFLUENCE OF THE MULTIPLE STERILIZATION PROCESS ON THE BIOMATERIAL PROPERTIES

DOROTA BOCIĄGA*, KRZYSZTOF JASTRZĘBSKI, ANNA OLEJNIK,
LIDIA ŚWIĄTEK, MARTA MARCHWICKA

ŁÓDŹ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND FUNCTIONAL MATERIALS
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND
*E-MAIL: DOROTA.BOCIĄGA@P.LODZ.PL

Abstract

Due to their favorable properties, numerous metallic materials, including titanium alloys are chosen for biomedical applications. A final preparation step before the implantation of a metallic biomaterial is sterilization. In fact, some of the devices may undergo a multiple sterilization process before they are placed into the human body. Although sterilization is a part of a standard procedure, it might affect the surface properties of the material. The purpose of this study was to check the influence of multiple sterilization process on surface properties and biological response of two titanium alloys: Ti6Al4V and Ti6Al7Nb. Samples of both alloys were mechanically polished and subjected to 1, 5 or 10 stem sterilization cycles. Representative samples from each group were examined in term of surface morphology (SEM), chemical composition (EDS), topography (profilometer) and wettability (sessile drop technique). Cell proliferation and cytotoxicity assay were carried out with the use of live/dead test of Saos-2 osteoblast-like cells line. Examinations showed that the multiple sterilization process caused occasional appearance of contaminations on the surfaces, as well as increase in the oxide layer thickness. Values of surface energy and surface roughness parameters increased with the increasing number of sterilization cycles. Proliferation of cells on the surface of sterilized titanium alloys was lower than in the case of stainless steel and control sample. At the same time, none of the examined samples showed cytotoxicity. Comparing two titanium alloys, considerably lower number of cells was observed on Ti6Al7Nb surface.

Keywords: Ti6Al4V, Ti6Al7Nb, multiple sterilization, surface roughness, wettability, biocompatibility

[Engineering of Biomaterials 136 (2016) 11-20]

Materiały używane do celów biomedycznych muszą charakteryzować się nie tylko odpowiednimi właściwościami mechanicznymi i fizykochemicznymi, ale muszą również właściwie i bezpiecznie współpracować z tkankami, z którymi pozostają w stałym kontakcie. Jedną z grup materiałów, które są szeroko wykorzystywane w medycynie jest grupa metali, które charakteryzują się dobrą biokompatybilnością. Metale te dobrze sprawdzają się m.in. w przypadku implantów narażonych na wysokie obciążenia. Ze względu na wysoką wytrzymałość, sztywność oraz odporność na pękanie, biomateriały metaliczne używane są przy produkcji wkrętów chirurgicznych, płytek kostnych oraz endoprotez stawów kolanowych, biodrowych bądź ramiennych [1]. Dzięki wysokiej biogodności oraz odpowiednim właściwościom mechanicznym i fizycznym, stopy tytanu są od wielu lat jednymi z najczęściej używanych metali do produkcji urządzeń medycznych [2,3]. Przed użyciem wszystkie wyroby medyczne muszą przejść proces sterylizacji. Sterylizacja pozwala wyeliminować wszelkie mikroorganizmy, takie jak bakterie, grzyby, wirusy i spory, obecne na powierzchni materiału. Nieodpowiednia sterylizacja może doprowadzić do infekcji, lub nawet do śmierci pacjenta [4]. W placówkach medycznych najczęściej używaną metodą sterylizacji jest obecnie sterylizacja parowa. Sterylizacja parowa jest łatwo dostępna, nieskomplikowana oraz bezpieczna dla środowiska, może jednak powodować również zmiany struktury materiałów, które są jej poddawane. Efektem czyszczenia i wielokrotnej sterylizacji może być korozja oraz utlenianie powierzchni metali [5].

Cechy powierzchni implantu, takie jak właściwości chemiczne, energia, topografia czy chropowatość wpływają na to, jakie oddziaływania zachodzą będą pomiędzy implantem a tkankami ciała. Kliniczne powodzenie implantu jest w dużej mierze zależne od wytworzenia się odpowiedniego połączenia pomiędzy implantem a tkankami. Niewystarczająca osseointegracja może spowodować niską wydajność urządzenia [6,7]. Chropowatość powierzchni wpływa na proliferację komórek oraz syntezę macierzy komórkowej [8,9]. Zwiększona chropowatość powierzchni powoduje lepszą osseointegrację pomiędzy implantem a tkankami [10-12], zakłada się jednak, że może istnieć pewien próg chropowatości, powyżej którego proliferacja komórek staje się utrudniona [13]. Zwiększona chropowatość powierzchni może wpływać korzystnie nie tylko na rodzaj oddziaływań pomiędzy tkankami ciała a implantem, ale również na właściwości mechaniczne połączenia [14]. Zwilżalność powierzchni biomateriału, w połączeniu z innymi jej cechami, może ułatwiać adsorpcję białek oraz wpływać na oddziaływania pomiędzy tkankami twardymi i miękkimi na granicy połączenia implant-tkanki ciała. Powierzchnie hydrofilowe ułatwiają adhezję i proliferację komórek w początkowej fazie kontaktu z urządzeniem [15-18].

Niektóre z implantów, takie jak płytki do zespołów kostnych, zamiast w oddzielnych opakowaniach mogą występować w zestawach, co wiąże się z ich przepakowywaniem i ponowną sterylizacją w przypadku, gdy zestaw nie został zużyty w całości [19]. Niekiedy też płytki i śruby są przechowywane razem z narzędziami chirurgicznymi wielokrotnego użytku, które są sterylizowane przed każdym zabiegiem [20]. Ze względu na te sposoby pakowania i przechowywania, niektóre z implantów mogą być poddane wielokrotnej sterylizacji zanim zostaną umieszczone w ciele pacjenta. Dotychczas wykazano, że na próbkach tytanowych poddanych wielokrotnej sterylizacji pojawiają się przebarwienia. Zauważono też zwiększone wartości kąta zwilżania wodą oraz mniejszą liczbę komórek na powierzchniach badanych próbek [21].

Introduction

To be applied in the biomedical field, material needs to exhibit certain properties. Apart from suitable mechanical and physicochemical characteristics, an appropriate and safe interaction between tissues and given biomaterial is required. One of the groups of materials that meet those requirements is a particular group of metals that exhibit good biocompatibility. Structural characteristics of metals make them good candidates for the majority of load-bearing implants. Their excellent strength, stiffness and resistance to fracture make them suitable for screws, bone plates, as well as knee, hip or shoulder prostheses [1]. Due to high biocompatibility, as well as good mechanical and physical properties, titanium alloys have been one of the most widely used metallic materials for medical purposes for many years [2,3]. Prior to implantations, all medical devices must undergo sterilization process. This process is of significant importance, as it kills harmful microorganisms, including bacteria, fungi, viruses and spores that could be present on the surface. Inappropriate sterilization may lead to infections and even death of patients [4]. When healthcare facilities are considered, steam sterilization is currently the most widely utilized method. Steam sterilization is easily accessible, simple and environmentally safe, however, it can also cause changes in the structure of materials. As the effect of cleaning and multiple sterilization corrosion and oxidation phenomena can occur on metallic materials surfaces [5].

Surface characteristics of implant, such as surface chemistry, energy, topography and roughness affect the interactions between the implant and host tissues. Clinical success of implants is highly dependent on the configuration of the interface between the implant and surrounding tissue - low osseointegration can cause poor implant efficiency [6,7]. Surface roughness can have an impact on such aspects as proliferation of cells, cells differentiation and matrix synthesis [8,9]. Increased surface roughness is usually correlated with better osseointegration between implants and tissues [10-12], however, it was also reported that there might exist a certain roughness threshold above which proliferation becomes difficult [13]. Increased surface topography was found to improve not only bone-to-implant contact but also mechanical properties of the interface [14]. Surface wettability of a biomaterial, combined with other surface characteristics, can influence protein adsorption as well as hard- and soft- tissue interactions on the implant-host interface. Due to the fact that less is known about how to mimic intrinsic wettability of bone, wettability is not a focus of most of the studies [15]. In the studies that have been carried out it was found, that hydrophilic surfaces facilitate cell adhesion, proliferation and differentiation at the early stages [15-18].

Some of the implants, especially bone plate systems, might be designed for repackaging and re-sterilizing if the kit was not utilized, rather than being individually wrapped [19]. Sometimes plates and screws might be also kept in caddies along with non-reusable surgical instruments, sterilized for multiple surgeries [20]. Due to those ways of packaging and storage some of the implants might undergo multiple sterilization process before they are placed into the human body. According to previous studies conducted on pure titanium samples, the increased number of sterilization cycles caused samples discoloration, increased water contact angles and inhibition of cells attachment and spreading [21].

W innym badaniu odnotowano niejednorodną warstwę tlenkową pojawiającą się w wyniku wielokrotnej sterylizacji drutów wykonanych ze stali nierdzewnej stosowanych do łączenia mostka. [22]. Przedstawione badania miały na celu określenie wpływu wielokrotnej sterylizacji oraz jej efektu w zależności od liczby cykli na właściwości powierzchniowe wybranych stopów tytanu, które są powszechnie używane przy wytwarzaniu biomateriałów: Ti6Al4V i Ti6Al7Nb.

Materiały i metody

Do badań użyto próbek wykonanych z dwóch stopów tytanu - Ti6Al4V i Ti6Al7Nb (Bibus Metals, Polska), spełniających odpowiednio normy ASTM B248 i ASTM F1295. Próbki zostały wyszlifowane mechanicznie przy użyciu papierów ściernych (SiC) o następującej gradacji: 80, 120, 220, 320, 500, 1200 i 2400. Po wyszlifowaniu zostały one wypolerowane z zastosowaniem diamentowej pasty polskiej oraz włókna polskiego. W wyniku powyższych procesów otrzymano próbki charakteryzujące się gładką, lustrzaną powierzchnią. Próbki zostały wysterylizowane (15 minut w temperaturze 121°C) przy użyciu autoklawu (AS25 SMS). Przygotowane zostały trzy zestawy próbek, z których każdy poddany został innej liczbie cykli sterylizacji (1, 5 lub 10).

Wysterylizowane próbki zostały przebadane pod kątem morfologii (SEM) i składu chemicznego (EDS) przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (JEOL) ze zintegrowanym analizatorem EDS X-MAX 80 (Oxford Instruments). Analiza została przeprowadzona w dwóch trybach obrazowania: SEI (secondary electron imaging – przy użyciu elektronów wtórnych) i BSE (backscattered electron imaging – przy użyciu elektronów wstecznie rozproszonych). Powierzchnia każdej z próbek została zobrazowana w dwóch obszarach przy użyciu różnych powiększeń (500x, 1000x i 5000x). Analiza EDS została przeprowadzona przy powiększeniu 500x w dwóch wybranych obszarach. Dodatkowo przeprowadzona została punktowa analiza EDS w celu identyfikacji zanieczyszczeń obecnych na powierzchni badanych próbek. Profilometr firmy Hommel Tester T100 został użyty do zbadania chropowatości powierzchni każdej próbki. Podczas pomiaru uzyskane zostały trzy różne parametry chropowatości: maksymalna chropowatość (Rmax), średnia chropowatość (Ra) oraz Wysokość chropowatości od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego (Rz). Pomiar przeprowadzono w trzech różnych miejscach, na podstawie czego wyznaczone zostały średnie wartości wybranych parametrów chropowatości. Analiza kąta zwilżania została przeprowadzona na aparacie Krüss EasyDrop. Pomiar kąta zwilżania został wykonany w trzech różnych miejscach każdej z próbek i przy użyciu dwóch cieczy: wody i diiodometanu. Uzyskane wartości posłużyły do obliczenia energii swobodnej w oparciu o model Owens-Wendta zgodnie z poniższymi równaniami (1-3):

$$1 + \cos \theta = \frac{2}{\gamma_L} \left[(\gamma_L^d \gamma_S^d)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_L^p \gamma_S^p)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (1)$$

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p \quad (2)$$

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (3)$$

γ_L - swobodna energia powierzchniowa cieczy pomiarowej
 γ_S - swobodna energia powierzchniowa badanego materiału
 $\gamma_L^d + \gamma_L^p$ - składowa dyspersyjna i polarna swobodnej energii powierzchniowej cieczy
 $\gamma_S^d + \gamma_S^p$ - składowa dyspersyjna i polarna swobodnej energii powierzchniowej badanego materiału
 θ - kąt zwilżania

Another examination revealed occurrence of non-uniform oxide layer at the surface of multi-sterilized sternal wire made of stainless steel [22]. This study aimed to determine the impact of multiple sterilization process and the effects of various numbers of cycles on the surface properties of two titanium alloys, that are commercially used as metallic biomaterials - Ti6Al4V and Ti6Al7Nb.

Materials and Methods

The samples of Ti6Al4V and Ti6Al7Nb (Bibus Metals, Polska), that meet the standards ASTM B348 and ASTM F1295, respectively, were used for the investigation. Samples were ground subsequently using 80-, 120-, 220-, 320-, 500-, 1200- and 2400-grit SiC papers and then mechanically polished with the use of diamond paste in order to obtain smooth, mirror-like surfaces. The obtained samples were next sterilized using autoclave AS25 SMS (121°C, 15 min). Three groups of the samples were prepared for each titanium alloy by applying 1, 5 or 10 steam sterilization cycles.

Microscopic examination of the sterilized samples was conducted with the use of JSM-6610LV scanning electron microscope (JEOL) coupled with EDS X-MAX 80 analyzer (Oxford Instruments). Two modes of imaging were used: secondary electron imaging (SEI) and backscattered electron imaging (BSE). For each sample two different regions were investigated under various magnifications (500x, 1000x and 5000x). Additionally, the EDS analysis was performed for two different regions under the magnification of 500x. Moreover, the spot EDS analysis was also performed in order to identify the impurities present on the examined surfaces. Hommel Tester T1000 profilometer was used in order to investigate surface roughness of the samples. Three roughness parameters have been obtained during the examination: maximum roughness (Rmax), average roughness (Ra) and peak-to-valley roughness (Rz). The average surface roughness parameters were calculated from three measurements, performed in different spots on the sample surface. Wettability of the material was assessed with the use of sessile drop method and Krüss EasyDrop system. The measurements were performed in three different spots for each sample using two different liquids, i.e. distilled water and diiodomethane. Having measured contact angles for both liquids, surface free energy was calculated using the Owens-Wendt model, according to the following equations (1-3):

$$1 + \cos \theta = \frac{2}{\gamma_L} \left[(\gamma_L^d \gamma_S^d)^{\frac{1}{2}} + (\gamma_L^p \gamma_S^p)^{\frac{1}{2}} \right] \quad (1)$$

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p \quad (2)$$

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p \quad (3)$$

γ_L - surface free energy of liquid

γ_S - surface free energy of the solid

$\gamma_L^d + \gamma_L^p$ - individual components of the surface energy γ_L (dispersive and polar)

$\gamma_S^d + \gamma_S^p$ - individual components of the surface energy γ_S (dispersive and polar)

θ - contact angle on the liquid/solid boundary

Wysterylizowane próbki użyto również do określenia wpływu wielokrotnej sterylizacji na odpowiedź biologiczną. W tym celu wykorzystany został test live/dead oraz komórki kościotwórcze linii Saos-2 (ATCC). Badania na komórkach zostały poprzedzone wyczyszczeniem próbek w myjce ultradźwiękowej z wykorzystaniem najpierw acetonu, następnie wody destylowanej, a na koniec etanolu. Jako kontrole wykorzystano komórki niebędące w kontakcie z żadną powierzchnią metaliczną. Hodowle prowadzono w medium hodowlanym McCoy's 5A (ATCC) przez 48 h w standardowych warunkach (37°C, w atmosferze zawierającej 5% CO₂, 100% wilgotności). Wszystkie eksperymenty przeprowadzone były z początkową gęstością wysiewu komórek równą 60000/cm². Analiza proliferacji i cytotoksyczności została przeprowadzona przy użyciu testu live/dead z wykorzystaniem Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes). Po 48 h inkubacji, próbki zostały poddane obserwacji przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Olympus GX 71) wyposażonego w kamerę cyfrową (DP90). Zdjęcia żywych i martwych komórek zostały zrobione w pięciu losowo wybranych miejscach na powierzchni próbek. Ilość żywych i martwych komórek na powierzchni próbek została wyznaczona przy użyciu programu ImageJ.

W celu analizy statystycznej otrzymanych wyników przeprowadzono jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA), przy poziomie istotności $p = 0,05$. Dla $p = 0,05$ wyniki zostały uznane za nieistotne statystycznie i oznakowane następującymi symbolami: x, +, o, #.

Wyniki i dyskusja

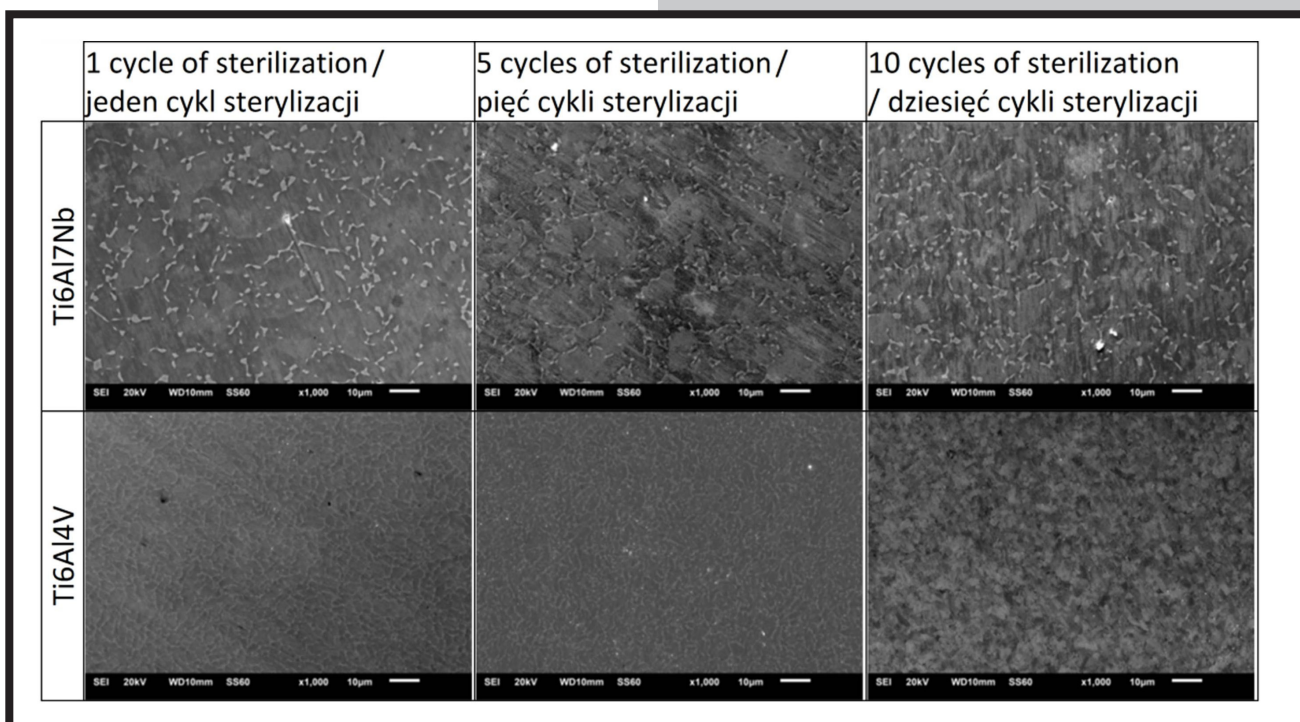
Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wielokrotnej sterylizacji na zmianę parametrów powierzchni dwóch stopów tytanu: Ti6Al7Nb i Ti6Al4V. Na zdjęciach SEM (RYS. 1) można zaobserwować wzrost chropowatości powierzchni próbek, co zostało potwierdzone przez późniejsze badanie chropowatości przy użyciu profilometru.

The influence of the number of steam sterilization cycles on the biological response of both titanium alloys was evaluated using live/dead test and Saos-2 osteoblast-like cells line (ATCC). Prior to the biological evaluation the samples were ultrasonically cleaned: firstly in acetone, then in distilled water and eventually in ethanol. After that, the steam sterilization was performed (1, 5 or 10 cycles). Blank sample of cell culture were used as control sample. Cells were seeded on the examined samples and cultured in McCoy's 5A (ATCC) medium for 48 h in standard conditions (37°C, humidified atmosphere of 5% CO₂ in air). All cell culture experiments were performed with an initial seeding density of 60000/cm². For the evaluation of proliferation and cytotoxicity a Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes) was used. After 48 h the samples were observed under the fluorescence microscope (Olympus GX 71) equipped with a digital camera (DP90). The images showing the live and dead cells on the surface of the examined samples were taken in five different spots. Images were superimposed and the number of live and dead cells was calculated with the use of ImageJ software.

The statistical analysis of the obtained results was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $p = 0.05$. The results with $p = 0.05$ were considered to be not statistically significant and were marked using the following symbols: x, +, o, #.

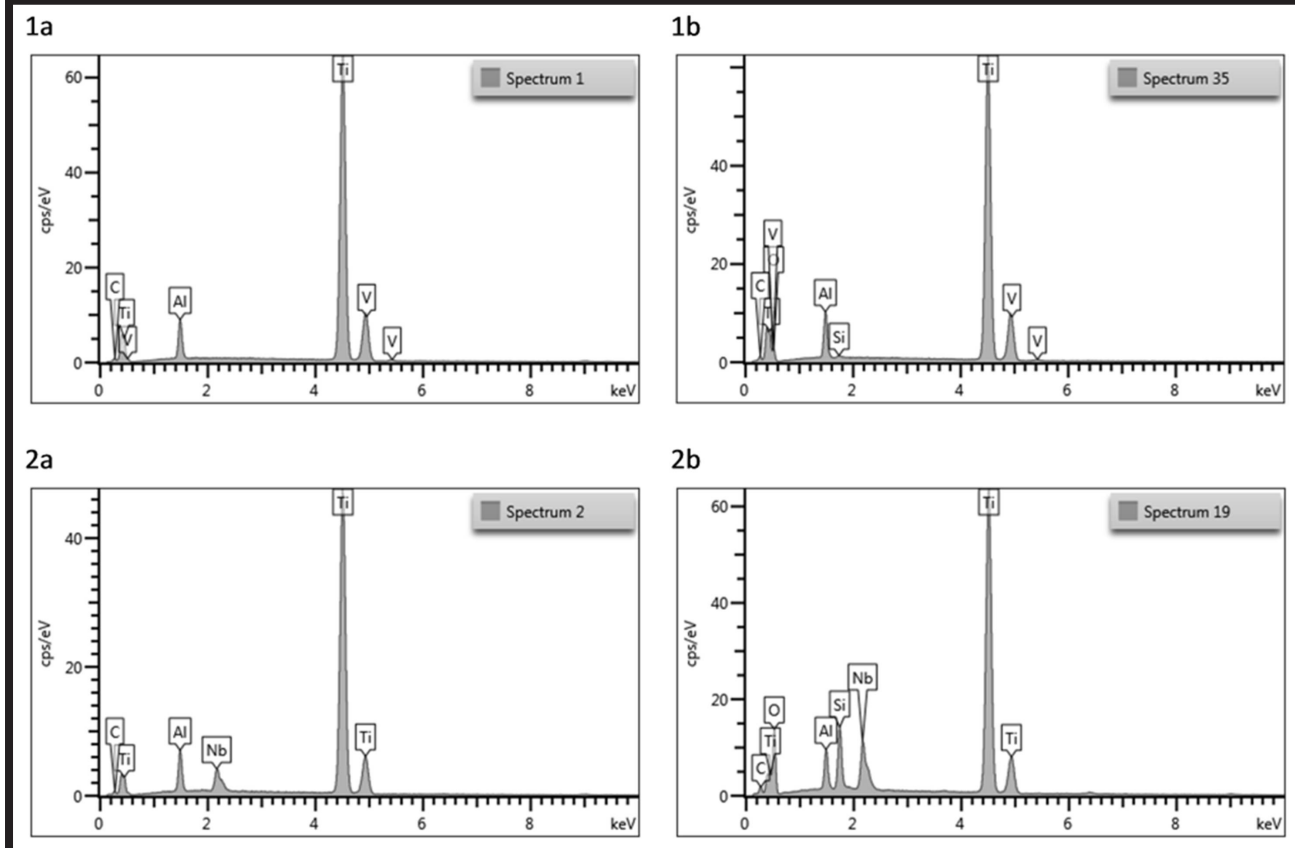
Results and Discussion

The aim of the study was to evaluate the influence of the multiple sterilization process on surface properties of two titanium alloys: Ti6Al7Nb and Ti6Al4V. FIG. 1 presents the SEM images of the examined surfaces. It may be observed that surfaces became more rough, what was confirmed by the profilometer examination.

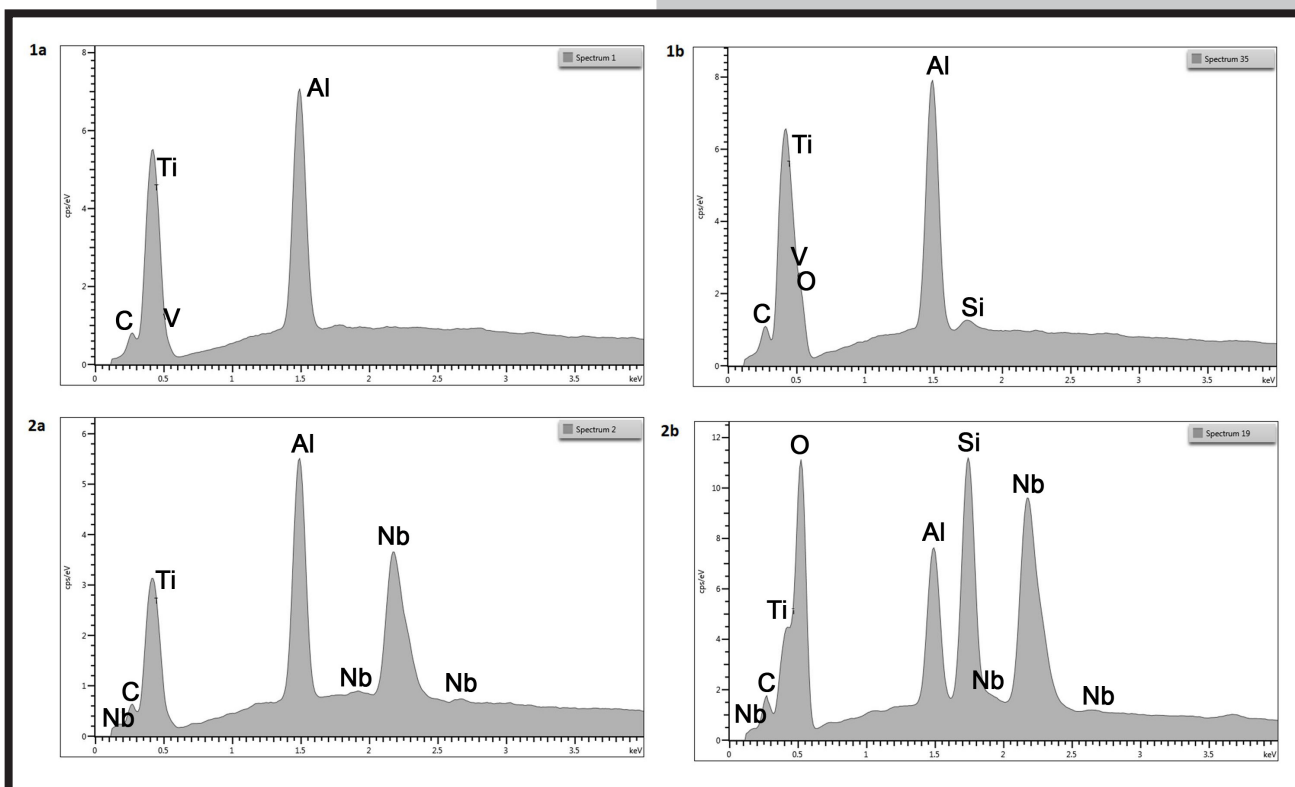


RYS. 1. Zdjęcia SEM próbek Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po jednym, pięciu i dziesięciu cyklach sterylizacji przy 1000x powiększeniu.

FIG. 1. SEM images of Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles at the magnification of 1000x.



RYS. 2. Widma EDS dla Ti6Al4V (1) i Ti6Al7Nb (2) po jednym (a) i dziesięciu cyklach (b) sterylizacji.
FIG. 2. EDS spectra of Ti6Al4V (1) and Ti6Al7Nb (2) samples after one (a) and ten (b) sterilization cycles.



RYS. 3. Powiększone zdjęcia ROI widm EDS dla Ti6Al4V (1) i Ti6Al7Nb (2) po jednym (a) i dziesięciu cyklach (b) sterylizacji.
FIG. 3. Magnified images of ROI of EDS spectra of Ti6Al4V (1) and Ti6Al7Nb (2) samples after one (a) and ten (b) sterilization cycles.

Na powierzchni wielokrotnie wysterylizowanych próbek można było zaobserwować brązowe przebarwienia. Poprzednie badania dotyczące tego zjawiska wskazują, że przyczyną jest miejscowa kondensacja wody oraz zwiększenie grubości warstwy tlenkowej [21,23]. Podczas procesu sterylizacji, w podwyższonej temperaturze, tytan reaguje z tlenem i wodorem powstałymi podczas dekompozycji wody, powodując pojawienie się zanieczyszczeń na powierzchni materiału oraz zmianę właściwości powierzchni [24,25]. Przeprowadzona analiza składu chemicznego metodą EDS również wykazała zmiany we właściwościach chemicznych powierzchni zachodzące na skutek wielokrotnej sterylizacji. Wzrost intensywności pasma pochodzącego od tlenu świadczyć może o zwiększonej grubości warstwy tlenkowej. Niektóre z poprzednich badań dotyczących sterylizacji parowej wykazały na powierzchniach obecność węgla, azotu i fosforu, pojawiającą się w skutek zanieczyszczeń ze środowiska [11,26]. Podczas obecnych badań na powierzchni próbek również zaobserwowano obecność węgla, nie wykryto jednak azotu czy fosforu. Dodatkowo, badanie EDS (RYS. 2) wykazało obecność krzemu na powierzchni badanych próbek, co może być spowodowane obecnością pozostałości po procesie szlifowania (osadzanie się cząsteczek pochodzących z papierów ściernych wykonanych z SiC).

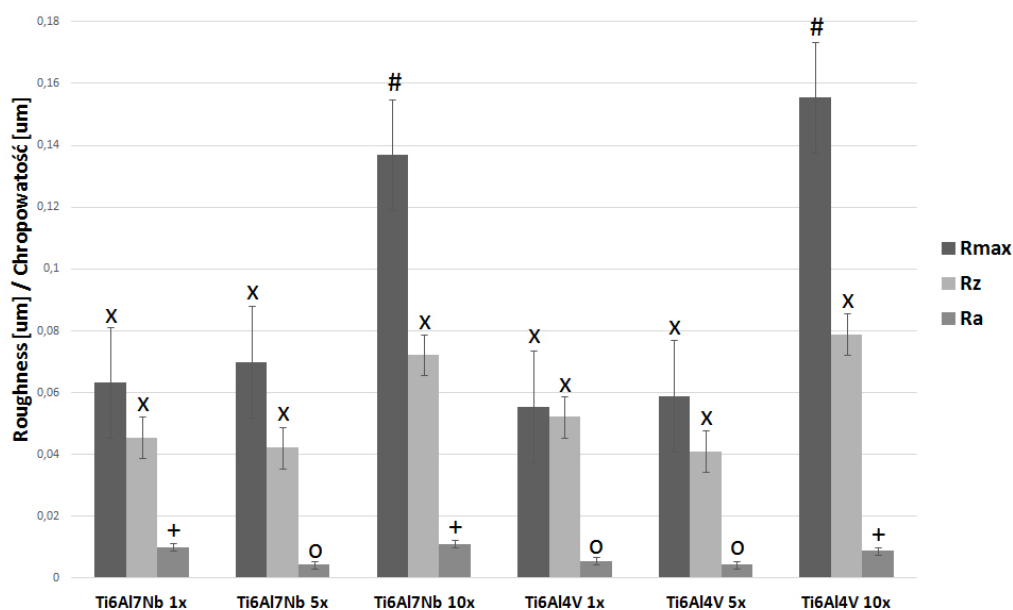
Analiza EDS ujawniła również zmiany w składzie chemicznym powierzchni. Zwiększona intensywność pików pochodzących od tlenu wskazuje, że grubość warstwy tlenkowej jest zwiększona (RYS. 3).

Na podstawie badań profilometrem wyznaczone zostały trzy parametry chropowatości: Rmax (chropowatość maksymalna), Rz (wysokość chropowatości od linii średniej wzdłuż odcinka pomiarowego) oraz Ra (średnia arytmetyczna odchylenia profilu). Podczas gdy wartości Ra nie uległy zdecydowanej zmianie, zaobserwowano znaczący wzrost parametru Rmax wraz ze wzrostem ilości cykli sterylizacji (RYS. 4). Największe wartości Rz zostały zmierzone dla próbek poddanych dziesięciu cyklom sterylizacji. Zmiany w wartościach parametrów Rmax oraz Rz na skutek wielokrotnej sterylizacji mogą wynikać z występowania miejscowych zanieczyszczeń powierzchni i zwiększenia grubości warstwy tlenkowej.

Moreover, on the surface of the samples that were exposed to multiple sterilization cycles, brownish stains were observed. Previous studies related to this effect explained this by the presence of contaminants at the localized water condensation spots and increased thickness of the oxide layer [21, 23]. In the increased temperature, which is present also during the steam sterilization process, titanium can react with oxygen and hydrogen formed by the decomposition of water, leading to the presence of contaminations and change of surface properties [24,25]. Current EDS examination also revealed changes in the surface chemistry. The increased intensity of the peak corresponding to oxygen suggests that the thickness of the oxide layer increased. Furthermore, some previous studies reported that carbon, nitrogen and phosphor were present on steam sterilized surfaces as a result of the environment contaminations [11,26]. In the present study carbon was also observed at the surfaces of samples, however no nitrogen or phosphor was detected. Additionally, the EDS analysis (FIG. 2) revealed the presence of silicone, which may be due to the presence of the residues from the process of surface preparation on the sample's surface (grinding on SiC papers).

Current EDS examination also revealed changes in the surface chemistry. The increased intensity of the peak corresponding to oxygen suggests that the thickness of the oxide layer increased (FIG. 3).

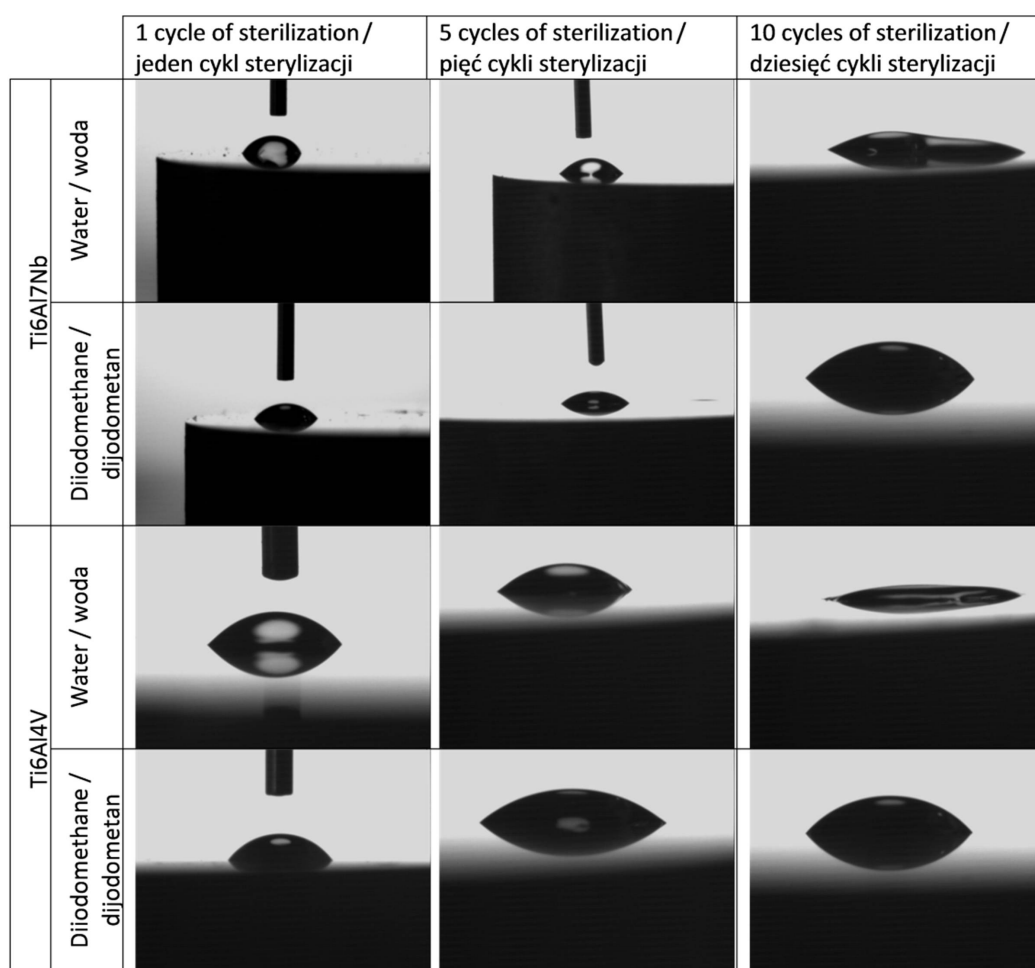
Following surface roughness parameters obtained during the profilometer measurements were taken into consideration: Rmax (maximum), Rz (peak-to-valley) and Ra (average). Although, no significant change in Ra parameter was observed, the value of Rmax increased noticeably for the samples exposed to the highest number of sterilization cycles (FIG. 4). The highest values of Rz were measured for samples after ten sterilization cycles. Those changes in Rmax and Rz parameters, found as a result of multiple sterilization, were associated with the occurrence of local contaminations and thickening of the oxide layer.



RYS. 4. Wartości Rmax, Rz i Ra dla Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po jednym, pięciu i dziesięciu cyklach sterylizacji. Symbolami oznaczono wyniki, w których występuje brak różnic znamienych statystycznie.
FIG. 4. Values of Rmax, Rz and Ra of Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles. Symbols denote results with no statistical significance.

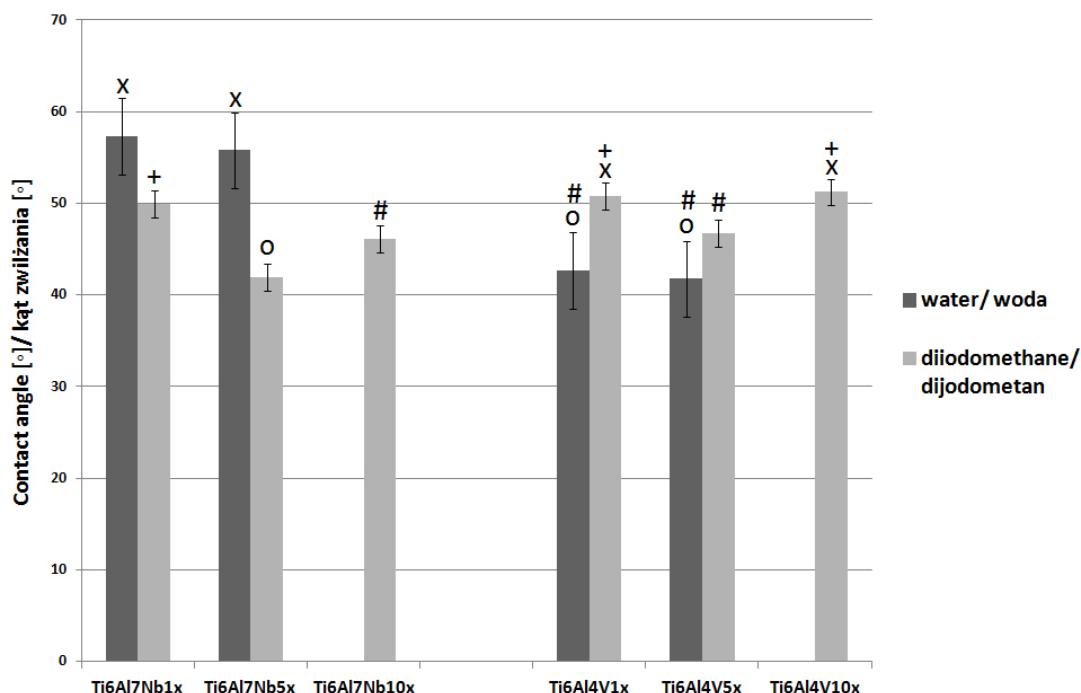
Analiza kątów zwilżania próbek Ti6Al7Nb i Ti6Al4V wskazuje na istotną zmianę zwilżalności powierzchni po wielokrotnej sterylizacji. Wraz ze zwiększeniem liczby cykli sterylizacji odnotowano zwiększenie wartości energii powierzchniowej próbek. Po jednym cyklu w autoklawie średnie wartości kąta zwilżania dla wody wynosiły $57,3^\circ \pm 11^\circ$ dla Ti6Al7Nb oraz $42,7^\circ \pm 5,2^\circ$ dla Ti6Al4V. Dla próbek poddanych dziesięciu cyklom sterylizacji zanotowano znaczący wzrost zwilżalności powierzchni (RYS. 5, 6, TABELA 1). W tych przypadkach wzrost energii powierzchniowej próbek spowodował spadek wartości kąta zwilżania dla wody poniżej wielkości możliwej do zmierzenia. Mniejsze wartości kątów zwilżania wskazują na zwiększoną hydrofilowość powierzchni. Uzyskane wyniki są sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, które wykazały spadek energii powierzchniowej i wzrost hydrofobowości na skutek sterylizacji próbek wykonanych z czystego tytanu [21,23]. Zmniejszenie wartości kątów zwilżania dla wody po wielokrotnej sterylizacji próbek może być spowodowane zmianami właściwości chemicznych powierzchni. Sterylizacja parowa powoduje powstanie dwubiegunowej charakterystyki powierzchni, co oznacza, że może ona być zarówno donorem jak i akceptorem elektronów [23]. Wielokrotna sterylizacja może wpływać na rodzaj reakcji, które wystąpią na powierzchni próbki. Temperatura i ciśnienie podczas procesu wpływają na grubość warstwy tlenkowej oraz stopień utlenienia powierzchni [26].

Examination of contact angles for Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples revealed a substantial change in wetting properties of the samples subjected to multiple sterilization cycles. The increase in the number of sterilization cycles caused also increase in samples surface energy. After one sterilization cycle the values of water contact angle were equal to $57.3^\circ \pm 11^\circ$ for Ti6Al7Nb and $42.7^\circ \pm 5.2^\circ$ for Ti6Al4V. The significant increase in surfaces wettability of samples exposed to 10 sterilization cycles was observed (FIG. 5, 6, TABLE 1). Due to considerable increase in surface energy of the samples, values of water contact angle dropped below measurable threshold. Lower values of water contact angle indicate increased surface hydrophilicity. Those results are in contradiction to studies conducted on pure titanium, according to which the surface free energy decreases after the multiple sterilization process, making the surface more hydrophobic [21,23]. Decrease in contact angles after the sterilization process can be caused by changes in surface chemistry. Steam sterilized surfaces have bipolar surface characteristics, which means they can be both electron donor and acceptor [23]. The number of sterilization cycles could have an influence on the character of the reactions that occur on the surface of the samples. Temperature and pressure during the steam sterilization can impact oxide layer thickness as well as oxidation states of the surface [26].



RYS. 5. Zdjęcia kropli wody i diiodometanu umieszczonych na powierzchni próbek poddanych jednej, pięciu i dziesięciu cyklom sterylizacji.

FIG. 5. Pictures of drops of water and diiodomethane placed at the surface of Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles.



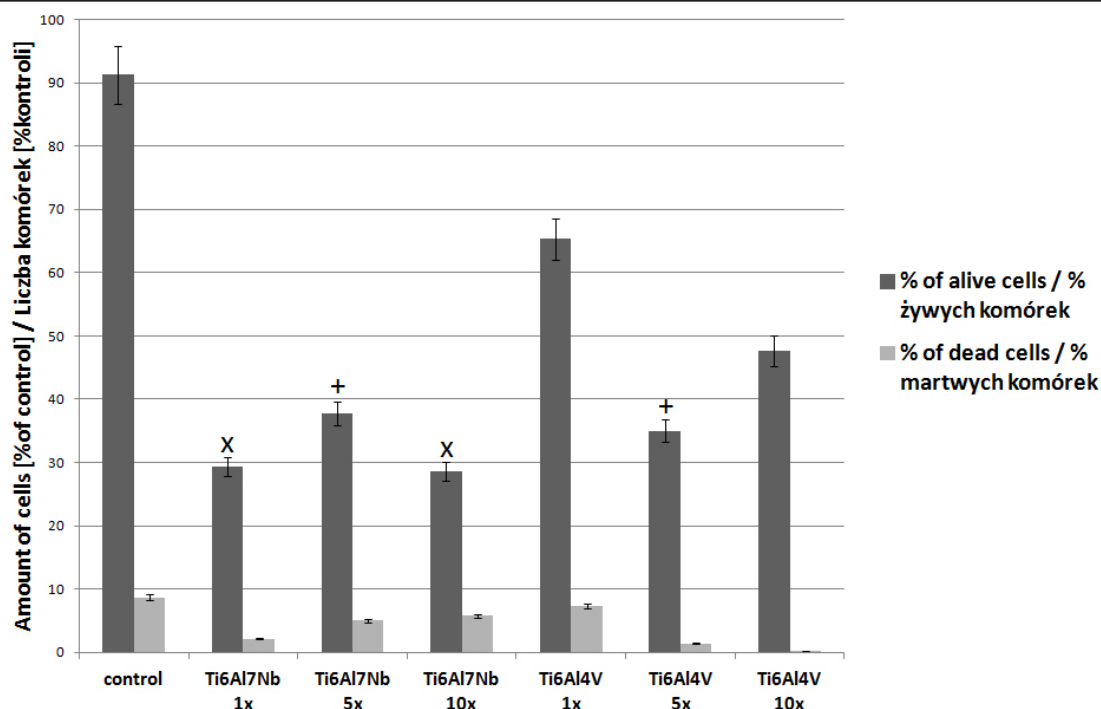
RYS. 6. Wartości kątów zwilżania wody i diiodometanu dla próbek po jednym, pięciu, i dziesięciu cyklach sterylizacji. Symbolami oznaczono wyniki, w których występuje brak różnic znamiennych statystycznie.
FIG. 6. Values of contact angle for water and diiodomethane for samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles. Symbols denote results with no statistical significance.

TABELA 1. Wartość energii powierzchniowej Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po jednym, pięciu i dziesięciu cyklach sterylizacji.
TABLE 1. Values of surface energy of Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles.

Samples		Składowa polarna Polar component [mJ/m ²]	Składowa dyspersyjna Dispersive component [mJ/m ²]	Total surface free energy Całkowita energia powierzchniowa [mJ/m ²]
Ti6Al7Nb	1 sterilization cycle 1 cykl sterylizacji	21.2 ± 7.2	25.07 ± 1.79	46.3 ± 5.6
	5 sterilization cycles 5 cykli sterylizacji	19.7 ± 4.1	29.13 ± 0.37	48.8 ± 3.8
	10 sterilization cycles 10 cykli sterylizacji	-	-	-
Ti6Al4V	1 sterilization cycle 1 cykl sterylizacji	33.4 ± 5.8	22.1 ± 2.9	55.5 ± 2.9
	5 sterilization cycle 5 cykli sterylizacji	32.37 ± 0.44	24.1 ± 2.1	56.5 ± 2.6
	10 sterilization cycle 10 cykli sterylizacji	-	-	-

Proliferacja komórek na powierzchniach próbek Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po wielokrotnej sterylizacji była znacząco niższa niż dla próbek kontrolnych i stali nierdzewnej AISI 316 LVM (RYS. 7). Żadna z próbek nie wykazała cytotoksyczności - nie zanotowano zwiększonej liczby martwych komórek w porównaniu do próbki kontrolnej. Co więcej, najniższą liczbę martwych komórek odnotowano na powierzchni Ti6Al4V po pięciu i dziesięciu cyklach sterylizacji. Liczba komórek na powierzchni próbek ze stopu Ti6Al7Nb była mniejsza niż w przypadku stopu Ti6Al4V.

As far as biological response is concerned, the proliferation of osteoblast-like cells decreased for all Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples when compared to control sample and AISI 316 LVM stainless steel (FIG. 7). However, it must be noted that none of the examined samples exhibited cytotoxicity towards the Saos-2 cells - no increase in the number of dead cells was noted in comparison to control sample. In fact, the lowest number of dead cells was observed on the surface of Ti6Al4V samples after 5 and 10 sterilization cycles. The number of cells on the surface of Ti6Al7Nb samples was lower than for the samples made of Ti6Al4V.



RYS. 7. Analiza żywych/martwych komórek dla próbki kontrolnej, stali nierdzewnej, oraz Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po jednej, pięciu, i dziesięciu sterylizacjach w autoklawie. Symbolami oznaczono wyniki, w których występuje brak różnic znamiennej statystycznie.

FIG. 7. Live/dead cells assay results for control, stainless steel and Ti6Al7Nb and Ti6Al4V samples after 1, 5 and 10 sterilization cycles. Symbols denote results with no statistical significance.

Przeprowadzone badania wykazały, że proces wielokrotnej sterylizacji wpływa na właściwości powierzchniowe stopów tytanu, powodując zmiany zarówno chropowatości, jak i zwilżalności. Zaobserwowano wzrost chropowatości dla próbek poddanych pięciu i dziesięciu cyklom sterylizacji. Zwilżalność próbek nie zmieniła się znacząco po pięciu sterylizacjach, jednak dziesięć cykli sterylizacji spowodowało znaczący wzrost hydrofilowości powierzchni oraz wzrost energii powierzchni. Proliferacja komórek kościotwórczych na powierzchni próbek poddanych wielokrotnej sterylizacji uległa zmniejszeniu w porównaniu do kontroli. Nie odnotowano jednakże bezpośredniej zależności pomiędzy zmianami w proliferacji komórek a zmianami właściwości powierzchniowych. Zmiana właściwości powierzchniowych może być spowodowana występowaniem zanieczyszczeń na powierzchni oraz zwiększeniem się grubości warstwy tlenkowej. Własności tej warstwy wpływają na wydajność implantu. Jednorodność warstwy tlenkowej jest konieczna dla uzyskania dobrych właściwości antykorozyjnych tytanu i jego stopów. Niejednorodna warstwa może nie chronić implantu kiedy znajdzie się on w środowisku biologicznym. Zmiany w stechiometrii, kompozycji chemicznej i grubości warstwy mogą być również związane z uwalnianiem produktów korozji tytanu do środowiska tkankowego [27-29].

Wnioski

Wyniki badań wykazały, że proces wielokrotnej sterylizacji powoduje zmiany w parametrach powierzchniowych stopów tytanu Ti6Al7Nb i Ti6Al4V. Podwyższona liczba cykli sterylizacji parowej spowodowała pojawienie się przebarwień oraz zwiększenie grubości warstwy tlenkowej. Lokalne zwiększenie grubości warstwy tlenkowej może negatywnie wpływać na integralność urządzenia kiedy zostanie ono już zaimplantowane. W wyniku zwiększenia liczby cykli sterylizacji zwiększeniu uległa również chropowatość powierzchni.

The presented results showed that the multiple sterilization process affects various surface properties, such as roughness and wettability. The increased number of sterilization cycles resulted in increased surface roughness. Wettability after five sterilization cycles changed slightly, however, the substantial increase in surface hydrophilicity and surface energy was observed after ten cycles. At the same time, the proliferation of Saos-2 cells was lower for the examined titanium alloys than for control samples, however, no simple relationship between the change in cell proliferation and the number of sterilization cycles as well as the resulting surface properties could be found. This is due to the fact that the number of cells on the surface of the examined samples was not directly proportional to the changes in surface roughness or wettability. The changes in the surface properties as a result of multiple sterilization process may be attributed to the occurrence of contaminants on the surface and increased thickness of the oxide layer. Properties of the titanium oxide layer were found to influence implant performance. The uniformity of the oxide layer is crucial for good anti-corrosive properties of titanium and its alloys. Non uniform oxide layer will not protect implant sufficiently once it is in the biological environment. Changes in the oxide stoichiometry, chemical composition and thickness are also associated with the release of titanium corrosion products [27-29].

Conclusion

Results of the performed research revealed that the multiple sterilization process is responsible for changes in surface properties of Ti6Al7Nb and Ti6Al4V titanium alloys. The increased number of steam sterilization cycles resulted in the appearance of contaminations and thickening of the surface oxide layer. Local thickening of the oxide layer can have a negative influence on the surface integrity if the implant once it is placed in the human body.

Odnotowano także wzrost energii powierzchniowej oraz zmiany zwilżalności powierzchni, w tym wzrost hydrofilowości, co może wpływać na zmienną odpowiedź biologiczną. Podczas badań przeprowadzonych na hodowli komórkowej odnotowano mniejszą liczbę komórek na powierzchniach próbek tytanowych niż w przypadku próbek kontrolnych. Pomimo tego, żadna z przebadanych próbek nie wykazała cytotoksyczności. Spośród dwóch użytych stopów, na powierzchniach wielokrotnie wysterylizowanych próbek Ti6Al7Nb zaobserwowano mniejszą liczbę komórek, oraz większy stosunek liczby komórek martwych do żywych. Może to sugerować, że zmiany we właściwościach powierzchni wywołane sterylizacją bardziej negatywnie wpływają na stop Ti6Al7Nb niż Ti6Al4V.

Podziękowania

Badania zostały przeprowadzone dzięki finansowaniu przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju dwóch projektów badawczych: akronim MoBioMED (umowa: LIDER/040/707/L-4/12/NCBR/2013) oraz CarLa (umowa: M-ERA.NET/2012/02/ 2014).

As a result of multiple sterilization the surface roughness of samples increased significantly. Multiple cycles of sterilization also led to increase in surface free energy and change in surface wetting properties, i.e. increased hydrophilicity, which may be the cause of changes in cell response. Cell proliferation and cytotoxicity assay showed that cell proliferation decreased in comparison to control samples. At the same time, none of the samples exhibited cytotoxicity towards the osteoblast-like cells. Among the examined samples, Ti6Al7Nb surfaces, that underwent multiple sterilization process, were characterized by lowest cell proliferation and highest dead to live cell ratio. This may suggest that changes in surface properties caused by sterilization process affect Ti6Al7Nb alloy more negatively than Ti6Al4V.

Acknowledgements

This research has been supported by the National Centre for Research and Development under the grant no. LIDER/040/707/L-4/12/NCBR/2013 entitled „MOBIOMED: Modified BIOmaterials – MEDicine future” and grant no. M-ERA.NET/2012/02/ 2014 entitled “CarLa – Ag/Si doped carbon layer for bio-medical application”.

Piśmiennictwo

- [1] H. Hermawan, D. Ramdan, J.R.P. Djuansjah: Metals for Biomedical Applications, Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia (2011).
- [2] H.J. Rack, J.I. Qazi: Titanium alloys for biomedical applications. Materials Science and Engineering 26, 8 (2006) 1269-1277.
- [3] M. Niinomi: Mechanical properties of biomedical titanium alloys. Materials Science and Engineering 243, 1-2 (1998) 231-236.
- [4] W.J. Rogers: Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices, Woodhead Publishing (2012).
- [5] Y.N. Zhou, M.D. Breyen: Joining and assembly of medical materials and devices, Woodhead Publishing (2013).
- [6] D. Buser, R.K. Schenk, S. Steinemann, J.P. Fiorenellini, C.H. Fox, H. Stich: Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pig. Journal of Biomedical Materials 25, 7 (1991) 889-902.
- [7] K. Anselmea, M. Bigerelle: Topography effects of pure titanium substrates on human osteoblast long-term adhesion. Acta Biomaterialia 1, 2 (2005) 211-222.
- [8] Z. Schwartz, J.Y. Martin, D.D. Dean, J. Simpson, D.L. Cochran, B.D. Boyan: Effect of titanium surface roughness on chondrocyte proliferation, matrix production, and differentiation depends on the state of cell maturation. J Biomed Mater Res 30 (1996) 145-155.
- [9] K. Kieswetter, Z. Schwartz, D.D. Dean, B.D. Boyan: The role of implant surface characteristics in the healing of bone. Crit Rev Oral Biol Med 7, 4 (1996) 329-345.
- [10] K. Gotfredsen, T. Berglundh, J. Lindhe: Anchorage of titanium implants with different surface characteristics: an experimental study in rabbits. Journal of Dentistry 30, 5-6 (2002) 195-203.
- [11] K. Suzuki, K. Aoki, K. Ohya: Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. Bone 21, 6 (1997) 507-514.
- [12] H.J. Ronold, J.E. Ellingsen: Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. Biomaterials 23, 21 (2002) 4211-4219.
- [13] L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, C. Martelet: Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior. Materials and engineering 23, 4 (2003) 551-560.
- [14] L.F. Cooper: A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. The Journal of Prosthetic Dentistry 84, 5 (2000) 522-553.
- [15] F. Rupp, R.A. Gittens, L. Scheideler, A. Marmur, B.D. Boyan, Z. Schwartz, J. Geis-Gerstorfer: A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. Acta Biomaterialia 10, 7 (2014) 2894-2906.

References

- [16] C. Eriksson, H. Nygren, K. Ohlson: Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. Biomaterials 25, 19 (2004) 4759-4766.
- [17] M.M. Bornstein, P. Valderrama, A.A. Jones, T.G. Wilson, R. Seibl, D.L. Cochran: Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. Clin Oral Implants 19, 3 (2008) 233-241.
- [18] R. McEvoy, P. McLiesh: The effect of multiple sterilizations on titanium and stainless steel plates and screws. Cambridge Publishing (2013)
- [19] F. Schwarz, M. Wieland, Z. Schwartz, G. Zhao, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, S.J. Ferguson: Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 88, 2 (2009) 544-557.
- [20] J.D. Bronzino: The biomedical engineering handbook, Springer Science & Business Media (2000)
- [21] P.J. Vezeau, G.F. Koorbusch, R.A. Draughn, J.C. Keller: Effects of Multiple Sterilization on Surface Characteristics and In Vitro Biologic Responses to Titanium. J Oral Maxillofac Surg. 54, 6 (1996) 738-746.
- [22] C.C. Shih, Y.Y. Su, L.C. Chen, C.M. Shih, S.J. Lin: Degradation of 316L stainless steel sternal wire by steam sterilization. Acta Biomaterialia 6, 6 (2010) 2322-2328.
- [23] M. Pegueroles, F.J. Gil, J.A. Planell, C. Aparicio: The influence of blasting and sterilization on static and time-related wettability and surface-energy properties of titanium surfaces. Surface & Coatings Technology 202 (2008) 3470-3479.
- [24] M.J. Donachie: Titanium: A Technical Guide, 2nd Edition, ASM International (2000).
- [25] G. Raj: Advanced inorganic chemistry, GOEL publ. house (1975).
- [26] Z. Chen, K. Zhou, Z. Li: Steam-induced changes in surface characteristics and corrosion resistance of spark-anodized titanium. Thin Solid Films 584 (2015) 161-164.
- [27] J.H. Park, R. Olivares-Navarrete, R.E. Baier, A.E. Meyer, R. Tannenbaum, B.D. Boyan, Z. Schwartz: Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. Acta Biomaterialia 8 (2012) 1966-1975.
- [28] L.D. Zardiackas, M.J. Kraay, H.L. Freese: Titanium, Niobium, Zirconium, and Tantalum for Medical and Surgical Applications, ASTM International, 2006.
- [29] C. Trepanier, M. Tabrizian, L.H. Yahia, I.L. Bilodeau, D.L. Piron: Effect of Modification of Oxide Layer on NiTi Stent Corrosion Resistance. Journal of Biomedical Materials Research 43, 4 (1997) 433-440.

OTRZYMYWANIE ORAZ CHARAKTERYSTYKA SKAFOLDÓW SIECIOWANYCH KWASEM TANINOWYM NA BAZIE CHITOZANU, KOLAGENU ORAZ KWASU HIALURONOWEGO

BEATA KACZMAREK*, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK

KATEDRA CHEMII BIOMATERIAŁÓW I KOSMETYKÓW,
WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA W TORUNIU
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ
*E-MAIL: BEATAKACZMAREK8@GMAIL.COM

Streszczenie

Biopolimery są szeroko stosowane w dziedzinie biomateriałów. Są biokompatybilne, biodegradowalne oraz nietoksyczne dla ludzkiego organizmu. Celem niniejszych badań eksperymentalnych było otrzymanie kompozytów na bazie kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego modyfikowanych poprzez dodatek kwasu taninowego. Biopolimery zostały wymieszane poprzez sporządzenie 1% roztworów każdego z nich, przy czym kolagen oraz chitosan były wymieszane w stosunku wagowym 50/50 oraz do tej mieszaniny zastosowano 1, 2 i 5 (w/w%) dodatek kwasu hialuronowego. Do mieszaniny dodano następnie 2, 5, 10 oraz 20 (w/w%) kwasu taninowego oraz otrzymano skafoldy metodą suszenia sublimacyjnego. Próbkę zarówno z dodatkiem kwasu taninowego jak i bez niego zostały scharakteryzowane poprzez pomiar ich właściwości mechanicznych, analizę spektroskopii w podczerwieni (IR-ATR) oraz obrazowanie przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Ponadto wyznaczono porowatość oraz gęstość każdego ze skafoldów. Wszystkie otrzymane próbki były porowate i nie zaobserwowano znaczących różnic w strukturze na zdjęciach SEM. Na widmach IR-ATR charakterystyczne piki polimerów takie jak: amidowe I, II, III oraz A były przesunięte po dodatku taniny w wyniku pojawienia się wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych. Wyniki pokazują, że kwas taninowy może być wykorzystany jako czynnik sieciujący stosowany w celu modyfikacji właściwości biomateriałów.

Słowa kluczowe: kolagen, chitozan, kwas hialuronowy, sieciowanie, kwas taninowy

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 21-27]

Wprowadzenie

Kolagen, chitozan oraz kwas hialuronowy zaliczane są do grupy biopolimerów. Kwas hialuronowy jest anionowym polimerem, jego duże ilości można znaleźć w macierzy zewnątrzkomórkowej i płynach maziowych. Kwas ten może być produkowany przez mikroorganizmy (na przykład szczepy paciorkowców) oraz z materiałów pochodzenia zwierzęcego (na przykład ciało szkliste, grzebienie kogucie, ludzka pępowa). Jego właściwości różnią się w zależności od jego masy cząsteczkowej. Przykładowo, wysokocząsteczkowy kwas hialuronowy pełni funkcję przeciwzapalną, a temu o niskiej masie przypisuje się cechy czynnika pro-zapalnego [1-3].

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF TANNIC ACID CROSS-LINKED SCAFFOLDS MADE OF CHITOSAN, COLLAGEN AND HYALURONIC ACID

BEATA KACZMAREK*, ALINA SIONKOWSKA,
EWELINA MARKIEWICZ, AGATA KOŁODZIEJCZAK

DEPARTMENT OF CHEMISTRY OF BIOMATERIALS AND COSMETICS,
FACULTY OF CHEMISTRY, NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY,
UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLAND
*E-MAIL: BEATAKACZMAREK8@GMAIL.COM

Abstract

Biopolymers are widely used in biomaterials science. They are biocompatible, biodegradable and non-toxic for human body. The aim of the study was to obtain scaffolds made of chitosan, collagen and hyaluronic acid modified by addition of tannic acid. The biopolymers were mixed as 1% solution, where collagen and chitosan were mixed in 50/50 (w/w%) and 1, 2 and 5 (w/w%) of hyaluronic acid was added. 2, 5, 10 and 20 (w/w%) of tannic acid was added to the mixture and scaffolds were obtained by freeze drying method. Samples with the tannic acid as well as without it were characterized by the mechanical parameters measurement, infrared spectroscopy (IR-ATR) and scanning electron microscopy (SEM). Moreover the porosity and density of the scaffolds were determined. The addition of tannic acid improves the mechanical properties and porosity of the scaffolds. All the scaffolds were porous and no significant changes in the structure were observed at the SEM images. In the IR-ATR spectra characteristic peaks of polymers as amide I, II, III and A were shifted after addition of tannic acid due to the presence of new hydrogen bonds and electrostatic interactions. The results show that tannic acid can be used as a cross-linking agent to modify the properties of the scaffolds.

Keywords: collagen, chitosan, hyaluronic acid, cross-linking, tannic acid

[Engineering of Biomaterials 136 (2016) 21-27]

Introduction

Collagen, chitosan and hyaluronic acid belong to the group of biopolymers. Hyaluronic acid is anionic polymer; its large amounts can be found in extracellular matrix and synovial fluids. It can be produced by microorganisms (for example pneumococcal strains) or isolated from natural sources (for example from vitreous, rooster combs, human umbilical cord). Its properties depend on the molecular weight. High molecular weight hyaluronic acid has anti-inflammatory function; however, this one with low molecular weight is a pro-inflammatory factor [1-3]. Collagen is the main protein in the mammals' body. Nowadays there are 29 types of collagen. It has a triple, right-twisted helix constructed by three left-handed amino acid chains. Main amino acids present in collagen structure form sequence of GLY-X-Y (GLY-glycine) where X and Y are proline and hydroxyproline.

Kolagen to jedno z najczęściej występujących białek w organizmie ssaków. Wyróżnia się 29 typów kolagenu. Białko to ma budowę potrójnej, skręconej prawoskrętnie, helisy, utworzonej z trzech lewoskrętnych łańcuchów sekwencji aminokwasowych. W strukturze kolagenu wyróżnia się sekwencję aminokwasów GLY-X-Y (GLY-glicyna), gdzie X i Y to zwykle prolina i hydroksypolina. W organizmach zwierzęcych kolagen przyspiesza gojenie się ran, konieczny jest do tworzenia i regeneracji naczyń krwionośnych, tkanki łącznej oraz wspomaga układ kostny [4-6]. Chitozan jest rozpuszczalnym w wodzie polimerem kationowym. Powstaje w wyniku deacetylacji chityny, przy czym aby powstał chitozan konieczne jest osiągnięcie 50% stopnia deacetylacji. Charakteryzuje się dobrą biogodnością, biodegradowalnością oraz właściwościami nawilżającymi, grzybobójczymi i antybakteryjnymi. Znalazł zastosowanie w medycynie oraz przemyśle kosmetycznym. Ze względu na możliwości adsorbujące włókna chitozanu można stosować w oczyszczalniach ścieków. Ponadto chitozan znalazł zastosowanie w szeregu branż, takich jak: spożywcza, tekstylna, papiernicza, fotograficzna, chemiczna [7-10].

Biopolimerom przepisuje się szereg cech, dzięki którym znalazły one zastosowanie w medycynie. Przede wszystkim istotna jest ich biokompatybilność, ale ceni się je również za łatwość modyfikacji i ponownego przetwarzania oraz odpowiednią cenę. Można je używać do produkcji materiałów stosowanych w dentystyce, implantologii, opatrunkach, protezach, w przemyśle farmaceutycznym, inżynierii tkankowej [11]. Tak szerokie zastosowanie powoduje, że są one częstym przedmiotem badań nad ich właściwościami i możliwościami modyfikacji.

Aby móc modyfikować biopolimery często stosuje się sieciowanie. Proces ten prowadzi do nadania nowych właściwości chemicznych oraz fizycznych. Wyróżnia się sieciowanie fizyczne, chemiczne i enzymatyczne. W przypadku fizycznego sieciowania wykorzystuje się wpływ temperatury oraz promieniowania (UV, gamma). Podczas sieciowania chemicznego zachodzi reakcja między polimerem a czynnikiem sieciującym [12-14].

W naszej pracy zaproponowano chemiczne sieciowanie mieszaniny wyżej wymienionych biopolimerów, takich jak kolagen, chitozan oraz kwas hialuronowy, za pomocą kwasu taninowego. Kwas ten zbudowany jest z glukozy i cząsteczek kwasu galusowego. Stosuje się go jako czynnik sieciujący w biomateriałach [15].

Materialy i metody

Kolagen został wyizolowany w laboratorium ze ścięgien szczurzych ogonów. Chitozan ($M_v = 5.4 \cdot 10^5$ g/mol; DD = 77%) został zakupiony w firmie Fluka oraz kwas hialuronowy (HA), jak i kwas taninowy (TA) zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich. Chitozan oraz kolagen (jako 1% roztwory w 0,1 M kwasie octowym) zostały zmieszane w stosunku masowym 50/50. HA (jako 1% roztwór w 0,1 M kwasie chlorowodorowym) został dodany w ilości 1, 2 oraz 5% wag. Kwas taninowy w postaci proszku został dodany do mieszaniny polimerów w ilości 2, 5, 10 oraz 20 % wag. jako czynnik sieciujący. Roztwory zostały umieszczone w polistyrenowych płytkach i zamrożone w temperaturze -80°C . Następnie zamrożone mieszaniny zostały poddane liofilizacji w temperaturze -55°C oraz pod ciśnieniem 5 Pa przez 48 h (ALPHA 1-2LD plus, CHRIST, Niemcy). Próbkę mieszaniny chitozanu oraz kolagenu zostały pozostawione jako próby kontrolne.

In animal bodies collagen enhances the healing of wounds, creation and regeneration of vessels, connective tissue and it supports the skeletal system [4-6]. Chitosan is soluble in water cationic polymer. It is obtained in deacetylation process from chitin, where it is necessary to obtain at least 50% of deacetylation degree. It is biocompatible, biodegradable and has moisturizing properties as well as antifungal and antibacterial ones. Chitosan found application in medicine and cosmetic industry. Moreover it is used in food, chemical, paper, photographic industry [7-10].

Biopolymers have many properties, which are relevant for their use in medicine. The main aspect is their biocompatibility, but also the easy way to modify their properties, possibility to recycle and reasonable price. Natural polymers can be used to produce materials for dental application, as dressing, dentures and tissue engineering [11]. Such wide application results that biopolymers are in a great interest for the research of their properties and new potential possibilities of modification.

Biopolymers can be modified by the cross-linking process. It can lead to new chemical and physical properties. Cross-linking process can be chemical, physical and enzymatic one. In the case of physical cross-linking process the temperature and radiation (UV or gamma) are used. During the chemical cross-linking the chemical reaction takes place between polymer and cross-linking agent [12-14].

The aim of this study was chemical cross-linking of triple components blend of biopolymers (collagen, chitosan and hyaluronic acid) by tannic acid addition. Tannic acid is built of glucose and gallic acid. It can be used as cross-linking agent in biomaterials [15].

Materials and Methods

Collagen was obtained from rat tail tendons in the laboratory. Chitosan ($M_v = 5.4 \cdot 10^5$ g/mol; DD = 77%) was purchased from Fluka and hyaluronic acid (HA) and tannic acid (TA) from Sigma-Aldrich. Chitosan and collagen (as 1% concentration in 0.1 M acetic acid) mixtures were prepared by mixing two solutions in the weight ratio 50/50. HA (as 1% concentration in 0.1 M hydrochloric acid) was added as 1, 2 and 5 w/w% addition. Tannic acid in a solid phase was added to the mixture of chitosan, collagen and hyaluronic acid as 2, 5, 10 and 20 w/w% addition as a cross-linking agent. Solutions were mixed and put into the polystyrene container and then placed in a freezer at -80°C . Frozen mixtures were lyophilized at -55°C and 5 Pa for 48 h (ALPHA 1-2LD plus, CHRIST, Germany). Chitosan/collagen scaffolds were left as control probes.

Spectra of the attenuated total reflected infrared spectroscopy were obtained. For scaffolds IR spectra were obtained using a Nicolet iS10 spectrophotometer equipped with an ATR device with diamond crystal [21]. All spectra were recorded in absorption mode at a 4 cm^{-1} interval and 64 scans.

The density and porosity of scaffolds were measured by isopropanol displacement, because it does not wet the sample [4]. Samples were put into the known volume of isopropanol. After 5 min the change in volume of isopropanol-impregnated scaffold was measured. The sample was removed from the solution and again the difference in isopropanol volume was determined. The density of the porous sample (d) was calculated:

$$d = \frac{W}{V_2 - V_3} \quad (1)$$

where: W is sample weight, V_2 is the total volume of isopropanol and isopropanol-impregnated scaffold, V_3 is the isopropanol volume after sample removing.

Spektroskopia w podczerwieni została wykorzystana do wykonania widm celem obserwacji położenia charakterystycznych pików pochodzących od grup znajdujących się w strukturze polimerów. Widma IR otrzymano wykorzystując technikę ATR z diamentem (Nicolet iS10). Wszystkie widma zostały zarejestrowane z rozdzielczością 4 cm^{-1} i liczbą 64 skanów.

Gęstość i porowatość scaffoldów zostały wyznaczone poprzez zanurzenie próbek w izopropanolu, ponieważ z jego użyciem zwilżanie scaffoldów nie jest obserwowane. Próbkę o znanej masie zostały umieszczone w określonej objętości izopropanolu. Po 5 min została zanotowana zmiana objętości izopropanolu, a następnie próbka została wyjęta i różnica objętości została zmierzona ponownie. Gęstość scaffoldu została wyznaczona ze wzoru:

$$d = \frac{W}{V_2 - V_3} \quad (1)$$

gdzie: W to masa próbki [mg], V_2 to objętość izopropanolu razem z zanurzoną próbką, V_3 objętość izopropanolu po wyjęciu próbki. Porowatość (ϵ) została obliczona na podstawie wzoru:

$$\epsilon = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: V_2 , V_3 to oznaczenia stosowane powyżej, V_1 to początkowa objętość izopropanolu.

Właściwości mechaniczne były mierzone przy użyciu maszyny wytrzymałościowej (Z.05, Zwick/Roell, Niemcy) dla każdego rodzaju próbki. Cylindryczne próbki o średnicy 15 mm oraz wysokości 14 mm były przygotowane do testów mechanicznych. Wszystkie pomiary były prowadzone w temperaturze oraz wilgotności pokojowej. Prędkość początkowa została ustawiona na 2 mm/min. Moduł ściskania to moduł Younga dla procesu ściskania, który określa sztywność elastycznej próbki. Jest liczony z nachylenia krzywej naprężenie-odkształcenie w liniowym obszarze (w obszarze odkształcenia od 2 do 5%). Dla każdego typu próbki wykonano minimum 10 pomiarów.

Morfologia próbek została zbadana przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, Anglia). Scaffoldy były przecięte skalpelem po zamrożeniu ich w ciekłym azocie przez 3 min. Próbkę były pokrywane złotem i obserwowana była wewnętrzna struktura kompozytu.

Wyniki i dyskusja

Przeprowadzono badania właściwości mechanicznych każdej z próbek; wyznaczone parametry takie jak moduł Younga oraz siła ściskająca są przedstawione w TABELI 1.

Dodatek kwasu hialuronowego do mieszaniny chitozanu oraz kolagenu powoduje początkowo zmniejszenie modułu Younga oraz siły zrywającej (dla 1% dodatku), a następnie zwiększenie parametrów mechanicznych. Dodatek kwasu tanninowego powoduje polepszenie właściwości mechanicznych w porównaniu z materiałami nieusięciowanymi. Najwyższy moduł Younga charakteryzuje próbkę chitozanu oraz kolagenu z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem kwasu tanninowego. Siła ściskająca osiąga najwyższe wartości dla próbki tego samego rodzaju, przy czym dodatek kwasu tanninowego nie powoduje znacznej zmiany wartości.

The porosity (ϵ) of the scaffold was calculated using the equation:

$$\epsilon = \frac{V_1 - V_3}{V_2 - V_3} \cdot 100\% \quad (2)$$

where V_2 , V_3 as above, V_1 is the initial volume of isopropanol.

Mechanical properties were measured by mechanical testing machine (Z.05, Zwick/Roell, Germany) for each kind of sample. Cylindrical samples with a diameter of 15 mm and height of 14 mm were prepared for mechanical testing. All measurements were carried out at room temperature and humidity. The cross-head speed was set at 2 mm/min. The compressive modulus is a Young's modulus for the compression process, where it determinates the stiffness of an elastic scaffold. It was calculated from the slope of the stress-strain curves in the linear region (strain from 2 to 5%). For each kind of sponge, at least ten samples were tested.

The morphology of the samples was studied using scanning electron microscope (SEM) (LEO Electron Microscopy Ltd, England). Scaffolds were cut with a razor scalpel after being frozen in liquid nitrogen for 3 min. Samples were covered with gold layer and the cross-section structure was observed.

Results and Discussions

Mechanical properties were measured for each kind of samples, mechanical parameters as Young's modulus and maximum compressive strength are shown in TABLE 1.

The addition of hyaluronic acid to the mixture of chitosan and collagen firstly decreases the Young's modulus and compressive strength (for 1% addition), and then the improvement of mechanical parameters was observed. The addition of tannic acid improves mechanical properties in comparison to materials which were not cross-linked. The highest Young's modulus characterizes the sample of chitosan and collagen with 5% addition of hyaluronic acid with 20% of tannic acid. Compressive strength has the highest values for the same kind of sample, where the addition of tannic acid does not cause any significant changes.

Infrared spectra were made to determine the localization of characteristic groups present in collagen, chitosan and hyaluronic acid structure, as well as to determine the presence of new bonds and interactions between polymers and between polymers and cross-linking agent. The spectra of chitosan, collagen and 5% hyaluronic acid with 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA) and without tannic acid addition (CTS/Coll/5HA) are presented in FIG. 1 and all of the results of IR analysis are shown in TABLE 2.

The addition of hyaluronic acid to chitosan/collagen blend leads to the shift of characteristic bands in IR spectra. It suggests that HA interacts with collagen and chitosan, probably by the hydrogen bonds and electrostatic interactions. The localization of C-O-C groups does not change more than 4 cm^{-1} where it is the value of IR device resolution. Addition of tannic acid causes the shift of peak from Amide A and III for the mixture of chitosan and collagen, and for scaffolds with hyaluronic acid addition Amide A and Amide I. Moreover the shift of Amide II bond is a result of the interaction between amine group and it means that new interactions are form between those groups and tannic acid.

The porosity of scaffold and its density measurement results are shown in TABLE 3.

TABELA 1. Parametry mechaniczne: moduł Younga (E_{mod}) oraz siła ściskająca (F_{max}) zmierzone dla kompozytów chitozanu/kolagenu (CTS/Coll), chitozanu/kolagenu z 1% kwasem hialuronowym (CTS/Coll/1HA), 2% (CTS/Coll/2HA) oraz 5% (CTS/Coll/5HA) z 2, 5, 10 oraz 20% dodatkiem kwasu taninowego (TA).

TABLE 1. Mechanical parameters as Young modulus (E_{mod}) and compressive strength (F_{max}) measured for chitosan/collagen scaffolds (CTS/Coll), chitosan/collagen with 1% hyaluronic acid (CTS/Coll/1HA), 2% (CTS/Coll/2HA) and 5% (CTS/Coll/5HA) with 2, 5, 10 and 20% addition of tannic acid (TA).

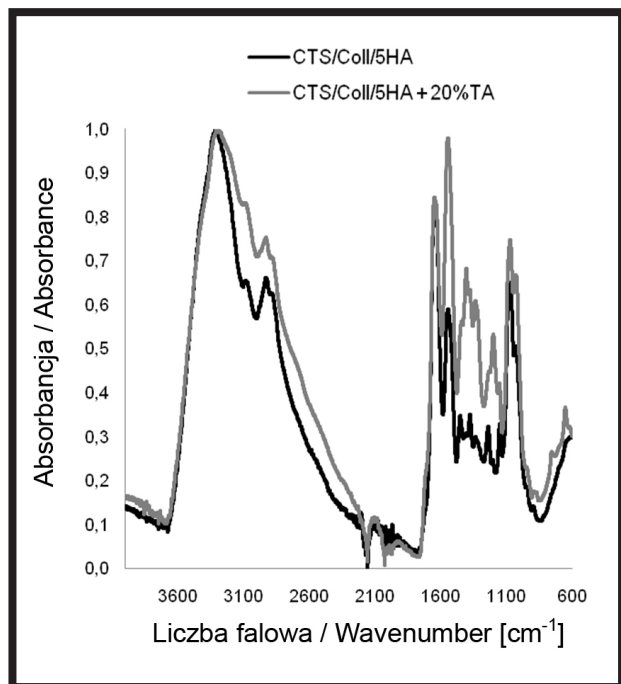
Scaffold Scaffold	E_{mod} [kPa]	F_{max} [kPa]
bez dodatku TA / without tannic acid (TA)		
CTS/Coll	1.95 ± 0.15	8.02 ± 0.16
CTS/Coll/1HA	3.92 ± 0.11	14.35 ± 0.12
CTS/Coll/2HA	5.73 ± 0.09	18.99 ± 0.09
CTS/Coll/5HA	5.17 ± 0.05	15.05 ± 0.11
2% TA		
CTS/Coll	19.2 ± 5.2	13.2 ± 2.1
CTS/Coll/1HA	6.8 ± 2.0	13.5 ± 0.4
CTS/Coll/2HA	28.6 ± 4.4	24.0 ± 4.2
CTS/Coll/5HA	36.4 ± 5.9	32.8 ± 2.7
5% TA		
CTS/Coll	23.4 ± 3.5	13.0 ± 1.3
CTS/Coll/1HA	13.0 ± 3.0	19.1 ± 1.9
CTS/Coll/2HA	21.6 ± 3.7	25.5 ± 2.3
CTS/Coll/5HA	34.9 ± 2.9	34.3 ± 2.5
10% TA		
CTS/Coll	13.9 ± 3.1	11.9 ± 1.4
CTS/Coll/1HA	13.0 ± 2.6	17.4 ± 0.6
CTS/Coll/2HA	29.4 ± 3.8	30.3 ± 1.0
CTS/Coll/5HA	35.5 ± 6.4	37.3 ± 3.7
20% TA		
CTS/Coll	16.1 ± 2.1	13.1 ± 1.6
CTS/Coll/1HA	12.2 ± 2.0	18.4 ± 0.7
CTS/Coll/2HA	17.0 ± 0.8	26.4 ± 1.4
CTS/Coll/5HA	41.1 ± 5.2	35.9 ± 1.8

Widma w podczerwieni zostały wykonane celem określenia położenia charakterystycznych grup w strukturze kolagenu, chitozanu oraz kwasu hialuronowego, jak również określenia wystąpienia wiązań lub oddziaływań między polimerami oraz pomiędzy polimerami i środkiem sieciującym. Przykładowe widma próbek chitozanu, kolagenu oraz 5% dodatku kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem taniny (CTS/Coll/5HA+20%TA) oraz bez czynnika sieciującego (CTS/Coll/5HA) zostały przedstawione na RYS. 1. Natomiast wszystkie wyniki analizy w podczerwieni zostały zestawione w TABELI 2.

TABELA 2. Charakterystyczne grupy funkcyjne kompozytów chitozanu oraz kolagenu z 2% dodatkiem kwasu taninowego (CTS/Coll+2%TA) oraz 20% (CTS/Coll+20%TA), jak również chitozanu i kolagenu z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego oraz 2% kwasu taninowego (CTS/Coll/5HA+2%TA) oraz 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA).

TABLE 2. Characteristic bands in IR spectra of chitosan/collagen scaffolds with 2% addition of tannic acid (CTS/Coll+2%TA) and 20% (CTS/Coll+20%TA) as well as chitosan/collagen and 5% addition of hyaluronic acid with 2% of tannic acid (CTS/Coll/5HA+2%TA) and 20% (CTS/Coll/5HA+20%TA).

Liczba falowa [cm^{-1}] Wavenumber [cm^{-1}]	Grupa funkcyjna Characteristic group
CTS/Coll	
3334	Amidowe A / Amide A
1628	Amidowe I / Amide I
1534	Amidowe II / Amide II
1245	Amidowe III / Amide III
1067	C–O–C
CTS/Coll+2%TA	
3329	Amidowe A / Amide A
1629	Amidowe I / Amide I
1519	Amidowe II / Amide II
1243	Amidowe III / Amide III
1066	C–O–C
CTS/Coll+20%TA	
3324	Amidowe A / Amide A
1620	Amidowe I / Amide I
1514	Amidowe II / Amide II
1233	Amidowe III / Amide III
1067	C–O–C
CTS/Coll/5HA	
3335	Amidowe A / Amide A
1644	Amidowe I / Amide I
1538	Amidowe II / Amide II
1239	Amidowe III / Amide III
1072	C–O–C
CTS/Coll/5HA+2%TA	
3315	Amidowe A / Amide A
1635	Amidowe I / Amide I
1538	Amidowe II / Amide II
1239	Amidowe III / Amide III
1070	C–O–C
CTS/Coll/5HA+20%TA	
3313	Amidowe A / Amide A
1631	Amidowe I / Amide I
1524	Amidowe II / Amide II
1200	Amidowe III / Amide III
1072	C–O–C



RYS. 1. Widma IR skafoldu chitozanu, kolagenu oraz 5% dodatku kwasu hialuronowego z 20% dodatkiem taniny (CTS/Coll/5HA+20%TA) oraz bez czynnika sieciującego (CTS/Coll/5HA).

FIG. 1. IR spectra of chitosan, collagen, 5% hyaluronic acid with 20% addition of tannic acid (CTS/Coll/5HA + 20%TA) and without it (CTS/Coll/5HA).

Dodatek kwasu hialuronowego powoduje przesunięcie położenia pasm w widmach IR charakterystycznych grup. Może to sugerować, iż oddziałuje on z kolagenem oraz chitozaniem, prawdopodobnie poprzez tworzenie wiązań wodorowych oraz oddziaływań elektrostatycznych. Lokalizacja grupy C-O-C nie zmienia się więcej niż o 4 cm^{-1} , co jest rozdzielczością aparatu. Dodatek kwasu taninowego powoduje przesunięcie pików pasm pochodzącego od grup amidowej A oraz III dla mieszaniny chitozanu oraz kolagenu, natomiast dla kompozytów z kwasem hialuronowym przesunięcie jest obserwowane dla pasma amidowego A oraz I. Oznacza to pojawienie się nowych oddziaływań między tymi właśnie grupami a kwasem taninowym.

Porowatość skafoldu oraz gęstość próbek została zmierzona, a wyniki przedstawione w TABELI 3.

Dodatek kwasu hialuronowego zwiększa porowatość oraz gęstość próbek bez dodatku kwasu taninowego. Wraz ze wzrostem ilości kwasu taninowego porowatość rośnie w przypadku wszystkich próbek. Parametry te zależą od obecności kwasu taninowego, gdzie porowatość oraz gęstość rosną wraz ze wzrostem zawartości czynnika sieciującego. Wśród próbek z tą samą zawartością kwasu taninowego próbki z 5% dodatkiem kwasu hialuronowego mają niższą porowatość niż próbki z mniejszą zawartością kwasu lub bez jego dodatku.

Strukturę kompozytów chitozanu, kolagenu oraz kwasu hialuronowego z dodatkiem kwasu taninowego zaobserwowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Przykładowe zdjęcia SEM przedstawione są na RYS. 2. Nie mniej jednak wszystkie skafoldy zostały zbadane i scharakteryzowane jako materiały porowate z porami wzajemnie połączonymi [16,17]. Skafoldy bez dodatku kwasu hialuronowego mają strukturę bardziej warstwową niż próbki bez kwasu.

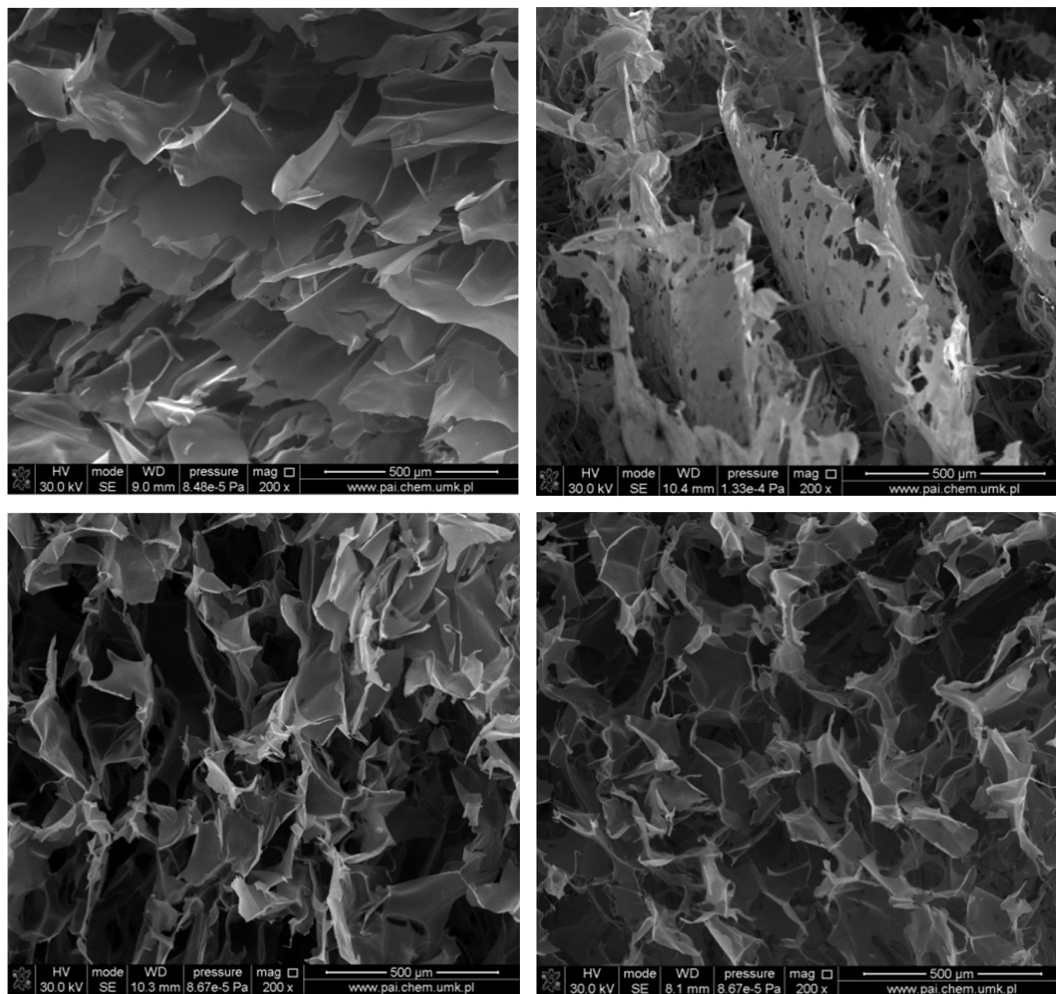
TABELA 3. Porowatość (ϵ) oraz gęstość (d) próbek z oraz bez dodatku kwasu taninowego.

TABLE 3. The porosity (ϵ) and density (d) of samples with and without tannic acid addition.

Scaffold Scaffold	ϵ [%]	d [mg/cm ³]
bez dodatku TA / without tannic acid (TA)		
CTS/Coll	60	19
CTS/Coll/1HA	65	21
CTS/Coll/2HA	69	39
CTS/Coll/5HA	71	43
2% TA		
CTS/Coll	71	40
CTS/Coll/1HA	73	46
CTS/Coll/2HA	72	12
CTS/Coll/5HA	56	23
5% TA		
CTS/Coll	78	44
CTS/Coll/1HA	74	54
CTS/Coll/2HA	76	16
CTS/Coll/5HA	71	25
10% TA		
CTS/Coll	84	45
CTS/Coll/1HA	79	56
CTS/Coll/2HA	89	24
CTS/Coll/5HA	72	27
20% TA		
CTS/Coll	91	24
CTS/Coll/1HA	81	20
CTS/Coll/2HA	91	33
CTS/Coll/5HA	77	33

Addition of hyaluronic acid increases the porosity and density for samples without tannic acid. After the increasing addition of tannic acid the porosity increases for all the samples. Those parameters depend on the tannic acid content, where porosity and density increase with increasing amount of tannic acid. With the same amount of tannic acid samples with 5% addition of hyaluronic acid have lower porosity than samples with lower content of HA or without it.

The structure of chitosan, collagen and hyaluronic acid scaffolds with tannic acid addition was observed with the use of scanning electron microscope. In the FIG. 2 examples of SEM images are shown. Nevertheless all obtained 3D samples were studied and they are characterized by porous structures with interconnected pores [16,17]. Scaffolds without hyaluronic acid have more layer by layer structure than those without it.



RYS. 2. Zdjęcia wykonane skaningowym mikroskopem elektronowym: a) CTS/Coll +2%TA, b) CTS/Coll +20%TA, c) CTS/Coll/5HA +2%TA, d) CTS/Coll/5HA +20%TA.

FIG. 2. Scanning electron microscope images of: a) CTS/Coll +2%TA, b) CTS/Coll +20%TA, c) CTS/Coll/5HA +2%TA, d) CTS/Coll/5HA +20%TA.

Wnioski

Nowe materiały kompozytowe mogą być otrzymane na bazie chitozanu, kolagenu oraz kwasu hialuronowego. Mogą być one sieciowane poprzez dodatek kwasu taninowego. Właściwości mechaniczne otrzymanych materiałów zależą od zawartości polimerów oraz procesu sieciowania. Dodatek kwasu hialuronowego zmniejsza sztywność skafoldu, ponieważ kwas hialuronowy silnie absorbuje wodę z powietrza. To sugeruje, iż materiał jest bardziej elastyczny. Proces sieciowania zachodzi na skutek formowania nowych oddziaływań elektrostatycznych oraz wiązań wodorowych, które wpływają na zmianę struktury materiałów oraz ich właściwości. Porowatość oraz gęstość materiału jest związana ze składem próbek. Dodatek kwasu taninowego zwiększa porowatość poprzez formowanie oddziaływań oraz reorganizację struktury skafoldu. Wszystkie otrzymane materiały są porowate z wzajemnie połączonymi porami, co jest niezbędne w przypadku potencjalnego ich zastosowania w inżynierii tkankowej.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za finansowanie badań w ramach projektu UMO-2013/11/B/ST8/04444.

Conclusions

New scaffolds can be obtained on the base of chitosan, collagen and hyaluronic acid. They can be cross-linked by addition of tannic acid. The mechanical properties of obtained scaffolds depend on the content of polymers used as well as on cross-linking process. Addition of hyaluronic acid reduces the stiffness of scaffolds because hyaluronic acid is hygroscopic. It suggests that materials are more elastic. The cross-linking process takes place by the presence of new interactions such as hydrogen bonds and electrostatic interactions which influence the scaffold structure and properties. The porosity and density of the scaffolds depends on the content of natural polymers. Addition of tannic acid increases the porosity due to the formation of new interactions and reorganization of scaffolds structure. All samples obtained in this study are porous with interconnected pores what is required for the scaffolds used in tissue engineering.

Acknowledgments

Financial support from the National Science Centre (NCN, Poland), grant no UMO-2013/11/B/ST8/04444 is gratefully acknowledged.

- [1] Vafaei S.N., Esmaeili M., Amini M., Atyabi F., Ostad S.N., Dinarvand R.: Self assembled hyaluronic acid nanoparticles as a potential carrier for targeting the inflamed intestinal mucosa. *Carbohydrate Polymers* 144 (2016) 371-381.
- [2] Tobiiishi M., Sayo T., Yoshida H., Kusaka A., Kawabata K., Sugiyama Y., Ishikawa O., Inoue S.: Changes in epidermal hyaluronan metabolism following UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science* 64 (2011) 31-38.
- [3] Kraft J.N., Lynde C.W.: Moisturizers: What they are and a practical approach to product selection. *Skin Therapy Letter* 10 (2005) 1-8.
- [4] Dong C., Lv Y.: Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers* 8 (2016) 1-20.
- [5] Ricard-Blum S.: The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2011) 1-20.
- [6] Faarvang A.S., Rørdam Preil S.A., Nielsen P.S., Beck H.C., Kristensen L.P., Rasmussen L.M.: Smoking is associated with lower amounts of arterial type I collagen and decorin. *Atherosclerosis* 247 (2016) 201-206.
- [7] Lazaridou A., Biliaderis C.G.: Thermophysical properties of chitosan, chitosan–starch and chitosan–pullulan films near the glass transition. *Carbohydrate Polymers* 48 (2002) 179-190.
- [8] Rinaudo M.: Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31 (2006) 603-632.
- [9] Dutta P.K., Dutta J., Tripathi V.S.: Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 63 (2004) 20-31.
- [10] Zeng Q., Qin J., Yin X., Liu H., Zhu L., Dong W., Zhang S.: Preparation and hemocompatibility of electrospun O-carboxymethylchitosan/PVA nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 133 (2016).

- [11] Parida P., Behera A., Mishra S.C.: Classification of biomaterials used in medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences* 8 (2012) 31-35.
- [12] Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K.: Characterisation of chitosan after cross-linking by tannic acid. *Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 19 (2014) 135-138.
- [13] Martínez A., Blanco M.D., Davidenko N., Cameron R.E.: Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers* 132 (2015) 606-619.
- [14] Dhayal S.K., Gruppen H., de Vries R., Wierenga P.A.: Controlled formation of protein nanoparticles by enzymatic cross-linking of α -lactalbumin with horseradish peroxidase. *Food Hydrocolloids* 36 (2014) 53-59.
- [15] Natarajan V., Krithica N., Madhan B., Sehgal P.K.: Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 5 (2013) 560-567.
- [16] Sionkowska A., Planecka A.: Preparation and characterization of silk fibroin/chitosan composite sponges for tissue engineering. *Journal of Molecular Liquids* 178 (2013) 5-14.
- [17] Sionkowska A., Kaczmarek B., Lewandowska K., Grabska S., Pokrywczyńska M., Klosowski T., Drewna T.: 3D composites based on the blends of chitosan and collagen with the addition of hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 89 (2016) 442-448.

RESORBOWALNE POKRYCIA POLIMEROWE NA DRUTACH ZE STOPU MAGNEZU MODYFIKOWANE TCP I ZnO

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ^{1*}, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK¹,
OLGA SIKORA¹, WITOLD RECZYŃSKI², MAGDALENA RZEWUSKA³,
JAN CHŁOPEK¹

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

² AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ,
AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

³ SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO,
WYDZIAŁ MEDYCYN WETERYNARYJNEJ,
KATEDRA NAUK PRZEDKLINICZNYCH,
UL. CISZEWSKIEGO 8, 02-786 WARSZAWA

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

Streszczenie

Magnez i jego stopy mogą stanowić obiecującą alternatywę dla tradycyjnie stosowanych biomateriałów metalicznych. Główne zalety materiałów na bazie Mg to: biogodność, biodegradowalność, osteokonduktywność, antybakteryjność oraz gęstość i moduł Younga zbliżone do naturalnej kości. Największą wadą jest ich zbyt gwałtowna degradacja, która może prowadzić do gromadzenia się wodoru oraz znacznego wzrostu pH w okolicznych tkankach; a także do przedwczesnej redukcji parametrów mechanicznych. Naukowcy próbują rozwiązać ten problem na różne sposoby: przez dobór pierwiastków stopowych, obróbkę powierzchniową, czy stosowanie powłok. Przedstawiona praca dotyczy zastosowania resorbowalnych materiałów polimerowych na pokrycia drutów ze stopu magnezu. Powłoki otrzymano metodą zanurzeniową z roztworów polilaktidu (PLA) i polikaprolaktonu (PCL) o różnych stężeniach. Otrzymane materiały inkubowano w buforze fosforanowym i wodzie destylowanej przez 7 tygodni. Monitorowano zmiany pH, przewodnictwa jonowego oraz uwalnianie kationów Mg^{2+} . Wykazano wpływ stężenia roztworu polimeru na jakość powłoki i skuteczność ochrony antykorozyjnej oraz korzystniejsze parametry powłoki PCL. W drugiej części pracy zaproponowano modyfikację wybranego powłoki fosforanem trójwapienia (TCP) i tlenkiem cynku (ZnO), które zostały wprowadzone do matrycy polimerowej. Badania właściwości mechanicznych wykazały, że w rezultacie równoczesnego zastosowania TCP i ZnO wzrasta moduł Younga, a spada wytrzymałość i odkształcalność folii PCL/TCP/ZnO, jednak nie powinno to wpłynąć niekorzystnie na skuteczność powłoki. Analizy SEM i EDS powierzchni próbek inkubowanych w SBF potwierdziły potencjalną bioaktywność opracowanych układów.

Słowa kluczowe: stopy magnezu, polikaprolakton, polilaktyd, fosforan trójwapienia, bioaktywność, powłoki polimerowe

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 28-35]

RESORBABLE POLYMER COATINGS MODIFIED WITH TRICALCIUM PHOSPHATE AND ZINC OXIDE FOR MAGNESIUM ALLOY WIRES

ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ^{1*}, PATRYCJA DOMALIK-PYZIK¹,
OLGA SIKORA¹, WITOLD RECZYŃSKI², MAGDALENA RZEWUSKA³,
JAN CHŁOPEK¹

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

² AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY,
MICKIEWICZA AV. 30, 30-059 KRAKOW, POLAND

³ WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES - SGGW,
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,
DEPARTMENT OF PRECLINICAL SCIENCES,
UL. CISZEWSKIEGO 8, 02-786 WARSZAWA, POLAND

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

Abstract

Magnesium and its alloys can be a promising alternative for traditionally used metallic biomaterials due to their: biocompatibility, biodegradability, osteoconductivity, antibacterial activity, and resemblance of density and Young's modulus to the natural bone. Rapid corrosion, Mg alloys main disadvantage, causes hydrogen accumulation, harmful pH level increase in surrounding tissues, and premature loss of mechanical parameters. In order to solve those issues, scientists select appropriate alloying elements and apply different surface treatments or coatings. This research considers application of resorbable polymers as coating materials for magnesium alloy wires. Samples were dip-coated with various concentration polylactide (PLA) and polycaprolactone (PCL) solutions. Immersion tests were conducted for 7 weeks in phosphate buffered saline and distilled water; pH and ionic conductivity changes, and release of Mg^{2+} ions were monitored. We show the influence of polymer solution concentration on the coating quality and effectiveness of anticorrosive protection, as well as superior parameters of polycaprolactone. In the second part of the study, selected coating was modified with tricalcium phosphate (TCP) and zinc oxide (ZnO), that were incorporated into the polymer matrix. Mechanical studies revealed that after modification with those two types of particles Young's modulus increased, while tensile strength and elasticity of the foils decreased, however it should not affect the effectiveness of the coating. SEM and EDS analysis confirmed potential bioactivity of investigated materials.

Keywords: magnesium alloys, polycaprolactone, polylactide, tricalcium phosphate, bioactivity, polymer coatings

[Engineering of Biomaterials 136 (2016) 28-35]

Magnez i jego stopy są obecnie jednymi z najbardziej obiecujących biomateriałów metalicznych, które mogą znaleźć zastosowanie między innymi jako implanty ortopedyczne [1-4]. To szczególne zainteresowanie można tłumaczyć korzystnymi właściwościami mechanicznymi i biologicznymi oraz zdolnością magnezu i jego stopów do biodegradacji. Implanty tradycyjnie stosowane w ortopedii, np. do zespożeń kostnych to w większości niedegradowalne materiały metaliczne, które wymagają przeprowadzenia dodatkowej operacji usunięcia implantu, gdy ten spełni już swoją funkcję [5]. Natomiast odpowiednio zaprojektowany i przygotowany implant wykonany ze stopów magnezu powinien ulec kontrolowanej resorpcji, eliminując konieczność narażania pacjenta na powtórny interwencję chirurgiczną. Również z perspektywy właściwości mechanicznych magnez ma dużą przewagę nad pozostałymi biomateriałami metalicznymi (jak np. stopy tytanu), gdyż jego gęstość i moduł Younga są zbliżone do naturalnej kości, dzięki czemu można wyeliminować ryzyko przeszywnienia kości i w konsekwencji jej zaniku w miejscu implantacji. Magnez i jego stopy są także korzystniejsze z biologicznego punktu widzenia. Po pierwsze Mg jest pierwiastkiem naturalnie występującym w ludzkim organizmie, w dużej części właśnie w tkance kostnej; poza tym ma właściwości osteokonduktywne i wykazuje działanie antybakteryjne [6-8].

W przedstawionym wcześniej kontekście biodegradowalność magnezu jest bardzo istotną zaletą, jednak nie można zapomnieć o problemie gwałtownego przebiegu owej degradacji zwłaszcza w agresywnym środowisku płynów biologicznych, w którym główną rolę odgrywają aniony chlorkowe. Zbyt szybka degradacja magnezu może prowadzić do nagromadzenia wodoru, niebezpiecznego wzrostu pH w tkankach wokół implantu oraz przedwczesnej utraty właściwości mechanicznych [5]. Pracując nad rozwiązaniem tego problemu, naukowcy sięgają po różne środki – od dobrania odpowiedniego składu stopu, poprzez obróbkę powierzchniową [9], aż po stosowanie rozmaitych pokryć, głównie ceramicznych [5] i polimerowych [10,11]. Pokrycia ceramiczne na bazie fosforanów wapnia są oczywistym wyborem ze względu na zwiększenie potencjału bioaktywnego i związaną z tym integrację implant-tkanka kostna. Jednak krucha ceramika niezbyt dobrze współpracuje z powierzchnią metalu, co wiąże się z ryzykiem pojawienia się mikropęknięć i osłabieniem ochrony antykorozyjnej. Kompromisem może być zastosowanie pokryć kompozytowych na bazie polimerów biodegradowalnych, które pozwolą na wprowadzenie bioaktywnych modyfikatorów ceramicznych, zachowując jednocześnie elastyczność powłoki i dobrą przyczepność do podłoża [12].

Polimerami stosowanymi na biogodne i biodegradowalne pokrycia implantów metalicznych są np. PLA (poli(L-laktyd)) i PCL (poli(ε-kaprolakton)). PCL jest polimerem semi-krystalicznym (temperatura przejścia szklistego (T_g) -60°C), o właściwościach hydrofobowych i znacznej odkształcalności. Biomedyczne zastosowania polikaprolaktonu obejmują m.in.: systemy dostarczania leków, nici chirurgiczne, opatrunki ran, implanty do zespożeń oraz rusztowania dla inżynierii tkankowej [13]. PLA charakteryzuje się wysoką (jak na materiały polimerowe) wytrzymałością, modułem Younga i długim czasem resorpcji. Oba te polimery pozwalają na wprowadzenie do matrycy różnych faz modyfikujących i tym samym otrzymanie pokrycia kompozytowego o zaprojektowanych właściwościach. W poniższej pracy zaproponowano dwa dodatki: β-trójfosforan wapnia (TCP), który pozwala na uzyskanie bioaktywności [14] oraz tlenek cynku (ZnO) posiadający właściwości antybakteryjne [15].

Magnesium and its alloys are currently one of the most promising metallic biomaterials which can be used for orthopaedic implants [1-4]. This particular interest can be explained by favourable mechanical and biological properties, and the ability of magnesium and its alloys to biodegrade. Traditionally used orthopaedic implants (e.g. for bone unions) are mainly stable metallic materials that require revision surgery once the implant has fulfilled its task [5]. Properly designed and pretreated magnesium alloy implant should undergo resorption in a controllable manner, eliminating the need for additional surgical procedure. Also from mechanical perspective, magnesium has superior properties as compared to the rest of metallic biomaterials (e.g. titanium alloys) due to similarity of its density and Young's modulus to the properties of natural bone, which eliminates the risk of bone loss in the implantation area. Magnesium and its alloys are also beneficial from biological point of view. Mg is an element naturally occurring in human organism, mainly in bone tissue; moreover it has osteoconductive and antibacterial properties [6-8].

In the previously presented context, biodegradability of magnesium is an important asset, but one cannot forget about the rapid nature of Mg degradation, especially in the aggressive environment of biological fluids, in which chloride anions predominate. Rapid degradation of magnesium can cause hydrogen accumulation, harmful pH level increase in surrounding tissues, and premature loss of mechanical parameters [5]. Scientists try to solve this problem in many different ways – from choosing an appropriate alloying composition, through surface treatments [9], to application of various coatings, mostly ceramic [5] and polymeric [10,11]. Ceramic coatings based on calcium phosphates are an obvious choice due to increase in bioactive potential and associated bone tissue-implant integration. However, brittle ceramic works poorly with metal surface, what can result in microcracks occurrence and weakening of anticorrosive protection. A compromise may be the use of composite coatings based on biodegradable polymers, which allow the incorporation of bioactive ceramic modifiers, while maintaining coating elasticity and good adhesion to the substrate [12].

Polymers used for biocompatible and biodegradable coatings of metallic implants are, e.g. PLA (poly(L-lactide)) and PCL (poly(ε-caprolactone)). PCL is a semi-crystalline polymer (glass transition temperature (T_g) -60°C), of hydrophobic properties and relatively high strain. PLA is characterized by high (as for polymeric materials) strength and Young's modulus, and long resorption time. Biomedical application of polycaprolactone and polylactide include: drug delivery systems, surgical sutures, wounds dressings, fixation implants and tissue engineering scaffolds [13]. Both those polymers allow to introduce various modifying phases into the matrix and in this way produce composite coatings with designed properties. We used two modifiers: β-tricalcium phosphate (TCP), which brings bioactivity [14], and zinc oxide (ZnO), known for antibacterial properties [15].

This work aimed at evaluating the possibility of application of polymer matrix-tricalcium phosphate-zinc oxide composite system as multifunctional, biodegradable coating for magnesium alloy wires. In the first step, appropriate solution concentration and polymer were chosen; next the influence of modifiers on the bioactivity of the composite system was assessed.

Praca miała na celu ocenę możliwości zastosowania układu kompozytowego matryca polimerowa-fosforan trójwapnia-tlenek cynku na wielofunkcyjne, biodegradowalne pokrycia drutów wykonanych ze stopu magnezu. W pierwszym kroku dokonano selekcji stężenia i rodzaju polimeru, a następnie oceniono wpływ zastosowanych dodatków na bioaktywność układu.

Materialy i metody

Jako modelowego materiału magnezowego, użyto drutów ze stopu magnezu (Mg, Leibniz University of Hannover, Institute of Materials Science; $d = 0,97$ mm) o następującym składzie: do 88% Mg, 3% Al, 9% Li i do 1% Ca. W pierwszym kroku zastosowano obróbkę powierzchniową. Druty Mg poddano trawieniu przez 30 s w roztworze trawiącym (19 g 100% kwasu octowego, 5 g azotanu (V) sodu, 100 mL wody destylowanej), następnie płukano w wodzie destylowanej (dH_2O) i suszono (20 min., $70^\circ C$). Tak przygotowane próbki zostały pokryte różnymi roztworami polimerowymi przy pomocy metody zanurzeniowej.

Pierwsza część badań miała na celu określenie wpływu rodzaju polimeru użytego na pokrycie na jego skuteczność, dlatego przygotowano różne typy roztworów pokryciowych. Poli(L-laktyd) (PLA, Ingeo™ 3051D, Nature Works LCC) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL, Sigma-Aldrich, Mn = 80 000) rozpuszczono w dichlorometanie (DCM, Avantor Performance Materials Poland S.A.) uzyskując roztwory o stężeniu 10% w/v, 25% w/v, 50% w/v dla PLA i 10% w/v dla PCL, oznaczane w dalszej części jako PLA10, PLA25, PLA50 i PCL10. Próbki inkubowano w wodzie destylowanej (dH_2O) i buforowanym roztworze soli fosforanowych (PBS; o składzie 1,37 M NaCl, 14,7 mM KH_2PO_4 , 78,1 mM Na_2HPO_4 , 26,8 mM KCl) przez 7 tygodni, z cotygodniowym pomiarem pH i przewodnictwa jonowego. Uwalnianie kationów Mg określono przy pomocy Atomowej Spektrometrii Absorpcyjnej (ASA), techniką płomieniową (Perkin Elmer 3110; $\lambda = 285,2$ nm).

W drugiej części przygotowano pokrycia kompozytowe: fosforan trójwapnia (TCP) (5% wag.) i/lub tlenek cynku (ZnO) (5% wag.) rozpuszczono w DCM, zhomogenizowano przez sonifikację i następnie dodano do wybranego roztworu polimerowego (PCL) tak, by finalnie osiągnąć to samo stężenie (10% w/v). Analogicznie jak w pierwszej części, druty pokrywano metodą zanurzeniową. Przeprowadzono charakterystykę właściwości mechanicznych polikaprolaktonu i jego kompozytów użytych na pokrycia wykonując próbę rozciągania na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435) – określono wytrzymałość na rozciąganie (R_m , MPa), moduł Younga (E , MPa) oraz odkształcenie przy zerwaniu (ϵ_{break} , %). W celu oceny potencjalnej bioaktywności, próbki zanurzono w symulowanym płynie biologicznym (SBF, TABELA 1) w $37^\circ C$ na okres 4 tygodni, z cotygodniowym pomiarem pH. Morfologia i skład chemiczny wydzielin zostały określone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI) z analizatorem EDS.

Materials and Methods

As a model magnesium substrate, magnesium alloy wires (Mg, Leibniz University of Hannover, Institute of Materials Science; $d = 0.97$ mm) with following alloy content: up to 88% Mg, 3% Al, 9% Li and up to 1% of Ca, were used. Firstly surface treatment was applied. Mg wires were etched for 30 s in an etching solution (19 g 100% acetic acid, 5 g sodium nitrate (V), 100 ml distilled water), then rinsed with dH_2O and dried (20 min, $70^\circ C$). As prepared samples were covered with different polymer solutions by dip-coating method.

First part of the study aimed at assessing the influence of the type of polymer used as a coating material on its effectiveness, hence different kinds of coating solutions were prepared. Poly(L-lactide) (PLA, Ingeo™ 3051D, Nature Works LCC) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL, Sigma-Aldrich, Mn = 80 000) were dissolved in dichloromethane (DCM, Avantor Performance Materials Poland S.A.) to achieve 10% w/v, 25% w/v, 50% w/v solutions for PLA and 10% w/v solution for PCL; indicated herein after as PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10. Samples were incubated in distilled water (dH_2O) and phosphate buffered saline (PBS: 1.37 M NaCl, 14.7 mM KH_2PO_4 , 78.1 mM Na_2HPO_4 , 26.8 mM KCl) for 7 weeks, with weekly measurements of pH and ion conductivity. Release of Mg ions was evaluated by Atomic Absorbance Spectrometry (AAS), with flame technique (Perkin Elmer 3110; $\lambda = 285.2$ nm).

In the second part, composite coatings were applied: tricalcium phosphate (TCP) (5 wt%) and/or zinc oxide (ZnO) (5 wt%) were dissolved in dichloromethane (DCM), homogenised by sonification and then added to the chosen polymer solution (PCL) to achieve the same final concentration of 10% w/v. Analogically to the first part, wires were covered by dip-coating method. Polycaprolactone and its composite used for coatings were mechanically characterized by tensile test on universal testing machine (Zwick 1435) – tensile strength (R_m , MPa), Young's modulus (E , MPa) and elongation at maximum force (ϵ_{break} , %) were calculated. To evaluate potential bioactivity, samples were immersed in simulated body fluid (SBF, TABLE 1) in $37^\circ C$ for 4 weeks, with weekly pH monitoring. Morphology and chemical composition of the precipitates were assessed by scanning electron microscopy (SEM, Nova NanoSEM 200, FEI) with EDS analysis.

TABELA 1. Skład chemiczny symulowanego płynu biologicznego.

TABLE 1. Chemical composition of simulated body fluid.

Jon Ion	Stężenie jonów Ion concentration [mM]
Na ⁺	142.00
K ⁺	5.00
Mg ²⁺	1.50
Ca ²⁺	2.50
HCO ₃ ⁻	4.20
HPO ₄ ²⁻	1.00
SO ₄ ²⁻	0.50
Cl ⁻	147.96

Wyniki i dyskusja

Wpływ stężenia roztworu i rodzaju polimeru

W celu ochrony drutów ze stopów magnezowych przed zbyt gwałtowną degradacją zastosowano pokrycia polimerowe. Na podstawie przedstawionych poniżej zmian pH i przewodnictwa roztworu PBS i wody destylowanej oceniono skuteczność pokryć PLA i PCL oraz wpływ stężenia roztworu PLA, z którego nanoszono powłoki.

Przedstawione na RYS. 1 zmiany pH roztworu PBS, w którym inkubowano otrzymane próbki, wskazują wyraźny wpływ stężenia roztworu PLA z którego nanoszono powłoki na szybkość zmian wartości pH. Różnice były widoczne już po 4 dniach inkubacji, wykazując najmniejszą skuteczność powłok PLA10 i PLA50 i pogłębiały się od 4 tygodnia inkubacji, gdzie dla próbki Mg_PLA10 odnotowano wartość pH ok. 11. Wskazuje to na najmniejszą skuteczność powłoki PLA10. Co istotne, powłoka PCL otrzymana z takiego samego stężenia roztworu wykazywała najlepszą skuteczność w ochronie drutu magnezowego, umożliwiając stopniowy i równomierny wzrost pH.

Jak wskazuje RYS. 2, wzrost pH wody destylowanej związany z uwalnianiem magnezu następuje stopniowo w całym okresie inkubacji osiągając po 7 tygodniach wartość 8,4 dla Mg_PCL10 i 9,3 dla Mg_PLA25. Większy wzrost pH odnotowano dla pokrycia polilaktydowego i tendencja ta utrzymywała się w całym okresie obserwacji. Co istotne, wartości pH wody destylowanej są znacznie niższe niż roztworu PBS, pomimo jego buforujących właściwości, co wskazuje na wyraźnie szybszą degradację drutów w buforze fosforanowym.

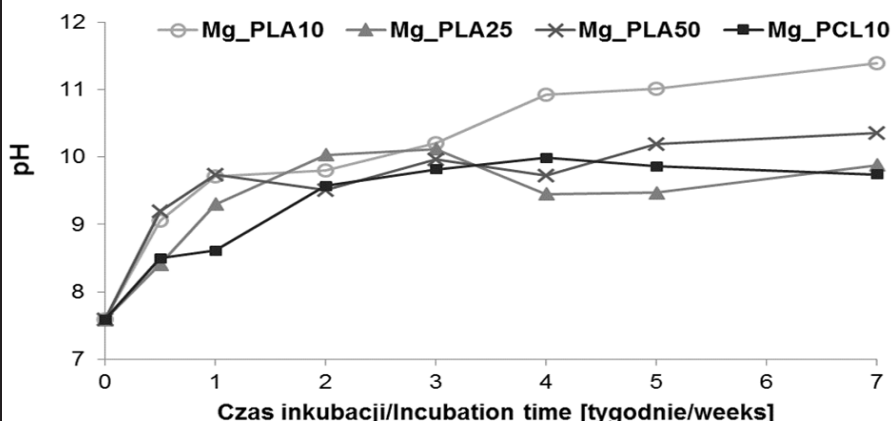
Results and Discussions

The influence of solution concentration and polymer type

In order to protect magnesium alloy wires from rapid corrosion, polymer coatings were applied. Based on pH and conductivity changes of PBS solution and distilled water presented below, efficiency of PLA and PCL coatings, and the influence of PLA solution concentration were assessed.

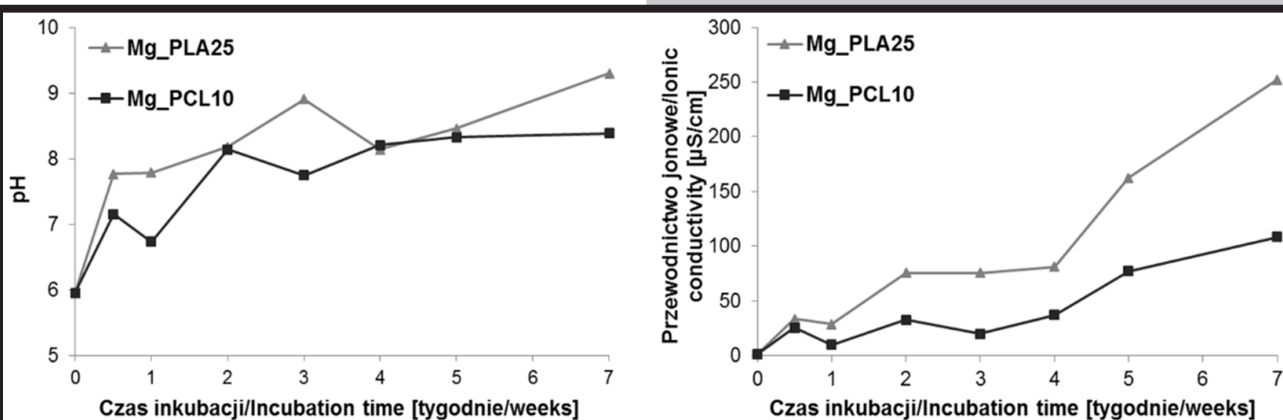
Changes of PBS buffer pH presented in FIG. 1 show clear influence of the initial solution concentration of the PLA coating on the rate of pH value changes. Differences in the pH were already visible after 4 days of incubation, demonstrating the lowest effectiveness of the PLA10 and PLA50 coatings. They increased after 4 weeks of incubation, when pH of approx. 11 was recorded for sample Mg_PLA10. It may suggest that the PLA10 was the least effective as the coating material. PCL coating from the same solution concentration showed the highest effectiveness in the magnesium alloy wire protection, allowing gradual and steady pH level increase.

FIG. 2 shows differences in the pH and ionic conductivity of the distilled water in which Mg samples coated with either PLA25 or PCL10 were immersed. pH level increase related to Mg ions release occurred gradually through the whole incubation period reaching, after 7 weeks, the value of 8.4 for Mg_PCL10 and 9.3 for Mg_PLA25. In general, higher increase in pH was observed for polylactide coated samples. Importantly, the pH of distilled water was much lower than of the PBS solution, despite buffering properties of the latter, which indicates a more rapid resorption of the wires in the phosphate buffered saline.



RYS. 1. Zmiany pH podczas 7-tygodniowej inkubacji w buforze fosforanowym (PBS) próbek Mg pokrytych PLA10, PLA25, PLA50 i PCL10.

FIG. 1. pH changes during 7-week incubation in phosphate buffered saline (PBS) of PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10 covered Mg samples.



RYS. 2. Zmiany pH oraz przewodnictwa jonowego podczas inkubacji w wodzie destylowanej próbek Mg pokrytych PLA25 i PCL10.

FIG. 2. pH and ion conductivity changes during incubation in distilled water of PLA25 and PCL10 covered Mg samples.

Podobną zależność można zaobserwować na podstawie zmian przewodnictwa wody destylowanej (RYS. 2), gdzie różnice są znacznie bardziej widoczne i wskazują na większą skuteczność pokrycia PCL. Niezwykle istotny jest stopniowy i równomierny przebieg degradacji drutu, tak aby możliwe było stopniowe odprowadzanie wodoru będącego produktem korozji magnezu. Równocześnie, stopniowe uwalnianie magnezu i tworzenie jego wodorotlenku zapewnia ciągłą alkalizację środowiska, której efektem jest działanie bakteriobójcze materiałów na bazie stopów magnezu [16,17].

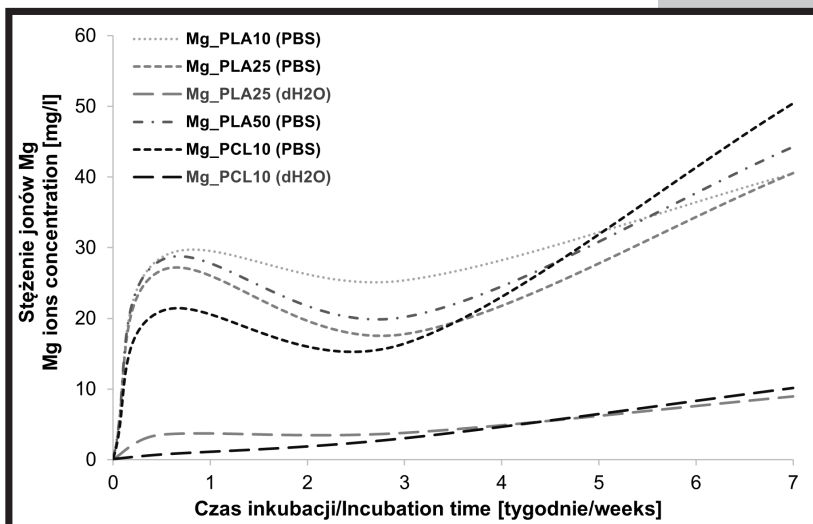
Wyniki uwalniania jonów Mg^{2+} potwierdzają najlepszą skuteczność powłoki PCL, zwłaszcza w początkowym okresie inkubacji, zarówno w PBS jak i w wodzie destylowanej (RYS. 3). Po 7 tygodniu wszystkie powłoki przestają już pełnić funkcję ochronną. Przedstawione wyniki wskazują na znacznie wyższe stężenie jonów Mg^{2+} w roztworze PBS niż w wodzie destylowanej, co potwierdza powyższe obserwacje, że bufor fosforanowy jest bardziej agresywnym środowiskiem.

Przedstawione wyniki dla różnych powłok PLA potwierdzają najlepszą skuteczność powłoki PLA25, a najniższą PLA10, co szczególnie widoczne jest po 3 tygodniach inkubacji. Stężenie roztworu wpływało na grubość nanoszonych powłok, stąd powłoka PLA10 jako najcieńsza wykazywała najmniejszą ochronę drutu Mg przed resorpcją. Z drugiej strony, duże stężenie roztworu (50%) skutkowało trudnościami w równomiernym pokryciu drutu. Przedstawione wyniki wskazują, że dla PLA nanoszonego ze stężenia 25% osiągnięto kompromis między grubością powłoki a jej równomiernym pokryciem na całej powierzchni drutu, a w konsekwencji najskuteczniejszą jego ochronę przed degradacją. Z drugiej strony, dla PCL o stężeniu 10% osiągnięto największą skuteczność w porównaniu do omówionych powłok PLA, co wydaje się być satysfakcjonujące. Wyższe stężenia PCL znacznie utrudniały nanoszenie powłok. Biorąc pod uwagę omówione wyniki, do drugiego etapu badań wytypowano powłoki na bazie polikaprolaktonu.

We observed similar pattern in the changes of ionic conductivity (FIG. 2), where the differences were even more visible and indicated an overall higher effectiveness of the PCL coating. Gradual resorption of the magnesium wire is important to allow gradual release of hydrogen (by-product of magnesium corrosion). At the same time, gradual release of magnesium and formation of its hydroxide provides continuous alkalization of the surrounding environment, which results in the antibacterial activity of magnesium alloy-based materials [16,17].

Mg^{2+} ions release studies confirmed the highest effectiveness of the PCL coating, especially during first few days of incubation in both: phosphate buffered saline and distilled water (FIG. 3). All of the coatings lost their protective function after seven weeks of incubation. Presented results show higher concentration of Mg^{2+} ions in the PBS solution, than in distilled water, what confirms above observations that phosphate buffer is a more aggressive environment.

Results presented for different PLA coatings confirm the best effectiveness of the PLA25 coating, and the lowest of the PLA10, what is especially visible after 3 weeks of incubation. Concentration of the polymer solution affected the coating thickness; PLA10 coating, the thinnest one, was the least effective as the Mg wire anticorrosive protection. On the other hand, high solution concentration (50%) resulted in difficulties in even coverage of the wire. With PLA coating from 25% solution concentration, we compromised between the coating thickness and its even deposition on the entire surface of the wire, and in consequence the most effective anticorrosive protection was achieved. Moreover, the PCL of 10% concentration was more effective than all of the different PLA coatings. Higher concentrations of PCL hindered the dip-coating. Based on the achieved results, PCL coatings were selected for further studies.



RYS. 3. Zmiany zawartości jonów Mg^{2+} podczas inkubacji w wodzie destylowanej i PBS drutów Mg pokrytych PLA10, PLA25, PLA50 oraz PCL10.

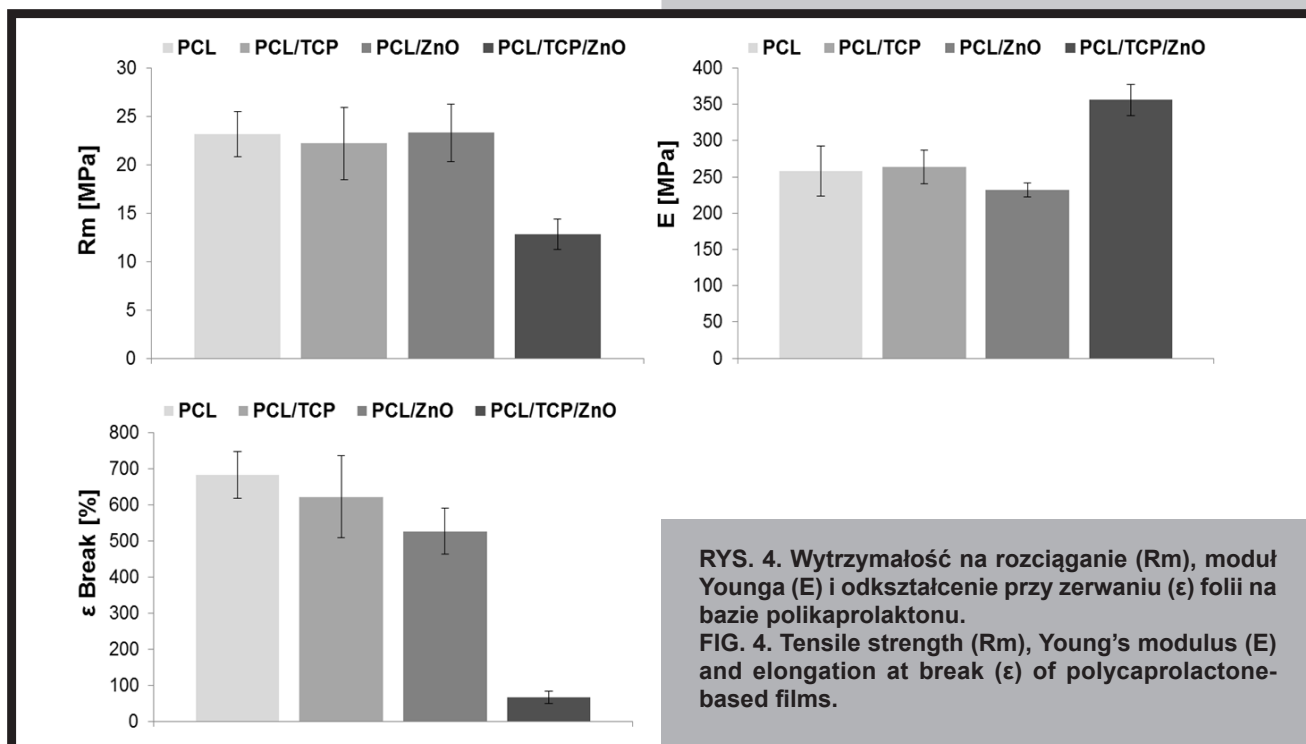
FIG. 3. Mg^{2+} ions concentration during immersion in distilled water and PBS of PLA10, PLA25, PLA50 and PCL10 covered Mg alloy wires.

Modyfikacja PCL dodatkami aktywnymi biologicznie (TCP, ZnO)

Powłokę PCL10 (dalej jako 'PCL'), jako najbardziej skuteczną w ochronie stopów magnezu przed zbyt gwałtowną degradacją poddano modyfikacji dodatkami ceramicznymi w celu nadania jej odpowiednich cech biologicznych. Inkorporacja TCP powinna zapewnić działanie bioaktywne, a ZnO został użyty jako materiał o działaniu antybakteryjnym. Oceniono wpływ stosowanych modyfikatorów ceramicznych na właściwości mechaniczne folii polimerowych oraz na bioaktywność drutów ze stopów magnezu pokrytych PCL modyfikowanym TCP i ZnO.

Modification of PCL with biologically active particles (TCP, ZnO)

The PCL10 coating (herein after as 'PCL'), as the most effective in magnesium alloys protection from rapid resorption, was modified with ceramic additives to achieve appropriate biological properties: TCP incorporation should ensure bioactivity, while ZnO should secure antibacterial activity. We evaluated the influence of the applied ceramic modifiers on mechanical properties of the polymer foils and bioactivity of the magnesium alloy wires covered with TCP and ZnO modified PCL.



Badania mechaniczne folii

Przeprowadzone badania mechaniczne nie wykazały istotnego wpływu zastosowania samego TCP i samego ZnO na wytrzymałość na rozciąganie oraz moduł Younga materiałów (RYS. 4). Zaobserwowano natomiast niewielki spadek odkształcalności po wprowadzeniu do matrycy ZnO. Wynika to zapewne z faktu, że wpływ na parametry mechaniczne ma wielkość uziarnienia stosowanych napelniaczy. Przy takim samym udziale procentowym (5%), nanometryczny TCP nie wpłynął istotnie na żaden z mierzonych parametrów, natomiast dodatek mikrometrycznego ZnO spowodował obniżenie odkształcalności. Równoczesne zastosowanie obu typów modyfikatorów spowodowało wzrost modułu Younga oraz obniżenie wytrzymałości i odkształcalności. Związane jest to ze zwiększeniem udziału napelniaczy, których sumaryczna zawartość wyniosła 10%. Jednak w dalszym ciągu parametry mechaniczne układu PCL/TCP/ZnO, w tym szczególnie moduł Younga, nie powinny powodować niekorzystnego wzrostu naprężeń wewnętrznych w powłoce polimerowej, jak to ma miejsce w przypadku znacznie sztywniejszego polilaktydu [12].

Ocena bioaktywności

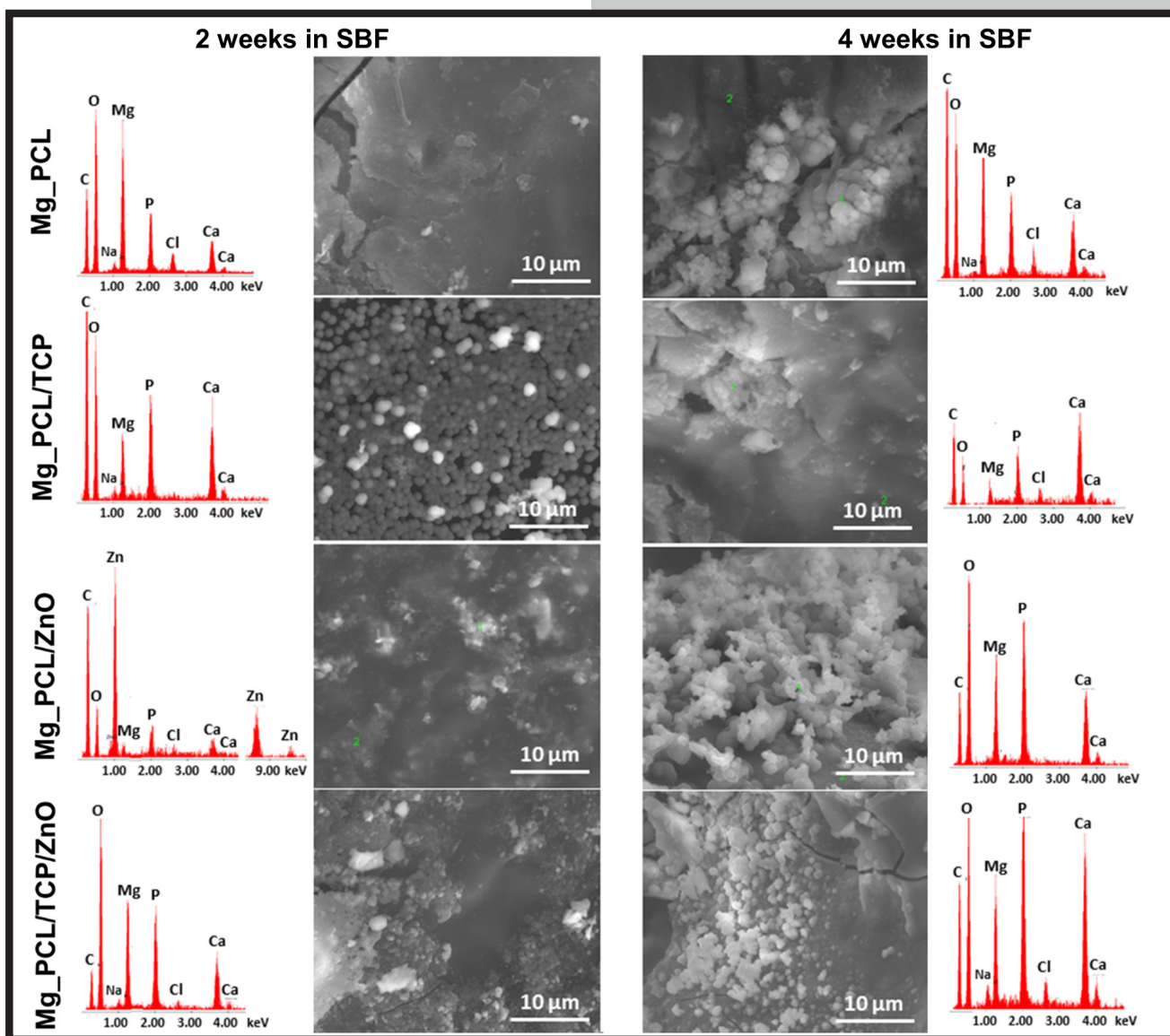
Inkubacja w symulowanym płynie biologicznym (SBF) pozwala na określenie potencjalnej bioaktywności materiału. Analizy SEM i EDS (RYS. 5) potwierdziły obecność wydzieli fosforanowo-wapniowych na powierzchni próbek inkubowanych w SBF przez okres 2 i 4 tygodni. Zaobserwowano także tlenki magnezu, powstałe w wyniku degradacji drutów ze stopu magnezu. Różnice w ilości powstałych wydzieli apatytowych (CaP) na poszczególnych materiałach są szczególnie wyraźne po 2 tygodniach inkubacji w SBF. Najwięcej wytrąconych fosforanów wapnia widocznych jest na powierzchniach materiałów zawierających dodatek TCP (Mg_PCL/TCP i Mg_PCL/TCP/ZnO), najmniej natomiast na drutach Mg pokrytych samym PCL. Zarówno morfologia wydzieli jak i analiza EDS wskazują na obecność wydzieli apatytowych. Co istotne, dodatek ZnO również przyspieszył wzrost apatytów w porównaniu do samego PCL. Analiza EDS wskazuje, że w powstających apatytach mogą występować podstawienia wapnia jonami cynku. Ponadto, wysoka zawartość magnezu w analizie EDS wszystkich materiałów może wskazywać na podstawianie wapnia jonami magnezu.

Mechanical studies

Mechanical studies revealed that TCP and ZnO used separately do not affect the tensile strength and Young's modulus of the composite materials (FIG. 4). However, small decrease in elongation was observed when the ZnO was used. Particle size influences mechanical parameters: with the same percentage (5 wt%) nanometric TCP did not affect studied parameters, while micrometric ZnO caused decrease in elongation. Simultaneous application of both modifiers resulted in increase in Young's modulus and decrease in strength and elongation. It relates to the increase in modifiers content, which achieved 10% in total. Mechanical parameters of the PCL/TCP/ZnO, including Young's modulus, should not cause the unfavourable increase in internal stresses of polymer coating, which is typical for much stiffer polylactide [12].

Bioactivity assessment

Incubation in simulated body fluid (SBF) allows to predict potential bioactivity of a material. SEM and EDS analysis (FIG. 5) confirmed presence of the calcium-phosphate precipitations on the surface of the samples immersed in SBF for 2 and 4 weeks. Magnesium oxides, products of magnesium alloy wires degradation, were also observed on the surface of the samples. Differences in the amount of apatites (CaP) deposited on the surface of each type of the samples were especially visible after 2 weeks incubation in the SBF. The most calcium phosphates were visible on the surface of the composites with addition of TCP and TCP/ZnO compounds, the least on the surface of the PCL coated wires. Both, analysis of the precipitates morphology and EDS analysis, indicated the presence of the apatites. What's important, addition of ZnO increased rate of apatites growth, as compared to PCL. EDS analysis showed that in the formulated apatites, calcium ions may be substituted with zinc ions. High content of magnesium, visible in the EDS spectra, may suggest substitution of calcium ions also with magnesium.



RYS. 5. Obrazy SEM wraz z analizą EDS powierzchni drutów magnezowych pokrytych PCL, PCL/TCP, PCL/ZnO i PCL/TCP/ZnO, inkubowanych w SBF przez 2 (lewa kolumna) i 4 tygodnie (prawa kolumna).
FIG. 5. SEM images with EDS analysis of PCL, PCL/TCP, PCL/ZnO and PCL/TCP/ZnO covered Mg wires, incubated in SBF solution for 2 (left column) and 4 weeks (right column).

Wnioski

Biomateriały na bazie biodegradowalnych stopów magnezu mogą stanowić obiecującą alternatywę dla powszechnie stosowanych materiałów metalicznych pod warunkiem zapewnienia odpowiedniego zabezpieczenia antykorozyjnego. Przeprowadzone badania pokazały, że istotny wpływ na jakość powłok polimerowych i skuteczność ochrony stopów magnezu przed działaniem środowiska zewnętrznego ma wyjściowe stężenie roztworu, z którego nanoszono powłokę. Lepsze zabezpieczenie antykorozyjne uzyskano przy zastosowaniu powłok z polikaprolaktonu, w porównaniu do polilaktydu. Dzięki wprowadzeniu do matrycy PCL fosforanu trójwapnia i tlenku cynku uzyskano pokrycia o właściwościach bioaktywnych, zachowując korzystne parametry mechaniczne polikaprolaktonu.

Podziękowania

Badania zostały wykonane w ramach grantu dziekańskiego nr 15.11.160.019 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Conclusions

Biomaterials based on biodegradable magnesium alloys can be a promising alternative for commonly used metallic materials providing proper anticorrosive protection. Our investigations showed that initial concentration of the coating solution affects the quality of the polymer coatings and their efficiency to protect magnesium alloys from the surrounding environment. We achieved better anticorrosive protection when polycaprolactone coatings were used, in comparison to polylactide. Thanks to incorporation of tricalcium phosphate and zinc oxide into the PCL matrix, we obtained bioactive coatings, while maintaining beneficial mechanical parameters of polycaprolactone.

Acknowledgments

This research was financed by the Dean grant No 15.11.160.019 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland.

[1] Witte F.: The history of biodegradable magnesium implants: A review, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1680-1692.

[2] Persaud-Sharma D., McGoron A.: Biodegradable Magnesium Alloys: A Review of Material Development and Applications., *J. Biomimetics, Biomater. Tissue Eng.* 12 (2012) 25-39. doi:10.4028/www.scientific.net/JBBTE.12.25.

[3] Cifuentes S.C., Frutos E., González-Carrasco J.L., Muñoz M., Multigner M., Chao J., et al.: Novel PLLA/magnesium composite for orthopedic applications: A proof of concept, *Mater. Lett.* 74 (2012) 239-242. doi:10.1016/j.matlet.2012.01.134.

[4] Li N., Zheng Y.: Novel Magnesium Alloys Developed for Bio-medical Application: A Review, *J. Mater. Sci. Technol.* 29 (2013) 489-502. doi:10.1016/j.jmst.2013.02.005.

[5] Iskandar M.E., Aslani A., Tian Q., Liu H.: Nanostructured calcium phosphate coatings on magnesium alloys: characterization and cytocompatibility with mesenchymal stem cells, *J. Mater. Sci. Med.* 26 (2015) 189. doi:10.1007/s10856-015-5512-5.

[6] Staiger M.P., Pietak A.M., Huadmai J., Dias G.: Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review., *Biomaterials.* 27 (2006) 1728-34. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.10.003.

[7] Cifuentes S.C., Bensiamar F., Gallardo-Moreno A.M., Osswald T.A., González-Carrasco J.L., Benavente R., et al.: Incorporation of Mg particles into PDLLA regulates mesenchymal stem cell and macrophage responses, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 104A (2016) 866-878. doi:10.1002/jbm.a.35625.

[8] Cifuentes S.C., Gavilán R., Lieblisch M., Benavente R., González-Carrasco J.L.: In vitro degradation of biodegradable polylactic acid/magnesium composites: Relevance of Mg particle shape., *Acta Biomater.* 32 (2016) 348-357. doi:10.1016/j.actbio.2015.12.037.

[9] Drynda A., Hassel T., Hoehn R., Perz A., Bach F.W., Peuster M.: Development and biocompatibility of a novel corrodible fluoride-coated magnesium-calcium alloy with improved degradation kinetics and adequate mechanical properties for cardiovascular applications, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 93 (2010) 763-775. doi:10.1002/jbm.a.32582.

[10] Xu L., Yamamoto A.: Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 93 (2012) 67-74. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.009.

[11] Witecka A., Yamamoto A., Idaszek J., Chlanda A., Świeszkowski W.: Influence of biodegradable polymer coatings on corrosion, cytocompatibility and cell functionality of Mg-2.0Zn-0.98Mn magnesium alloy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 144 (2016) 284-292. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.04.021.

[12] Johnson I., Michelle Wang S., Silken C., Liu H.: A systemic study on key parameters affecting nanocomposite coatings on magnesium substrates, *Acta Biomater.* 36 (2016) 332-349. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.026.

[13] Woodruff M.A., Hutmacher W.: The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217-1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

[14] Morawska-Chochol A., Domalik-Pyzik P., Szaraniec B., Chłopek J.: The effect of magnesium alloy wires and tricalcium phosphate particles on apatite mineralization on polylactide-based composites, *Mater. Lett.* 180 (2016) 1-5. doi:10.1016/j.matlet.2016.05.046.

[15] Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N.H.M., Ann L.C., Bakhori S.K.M., et al.: Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Lett.* 7 (2015) 219-242. doi:10.1007/s40820-015-0040-x.

[16] Domalik-Pyzik P., Morawska-Chochół A., Rzewuska M., Szaraniec B., Chłopek J.: Antibacterial activity study of poly(L-lactide) composites for novel biodegradable intramedullary nails, *Eng. Biomater.* 133 (2015) 7-13.

[17] Morawska-Chochół A., Domalik-Pyzik P., Chłopek J., Szaraniec B., Sterna J., Rzewuska M., et al.: Gentamicin release from biodegradable poly-L-lactide based composites for novel intramedullary nails, *Mater. Sci. Eng. C.* 45 (2014) 15-20. doi:10.1016/j.msec.2014.08.059.

**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/biomateriały-materiały-dla-medycyny/
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projektowania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spektroskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodniczych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla medycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią analizować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biogodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2016 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