

I N Z Y N I E R I A

BIMATERIAŁÓW

ENGINEERING OF BIOMATERIALS
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW

Numer 43-44
Rok VIII
ISSN 1429-7248

STYCZEŃ -
MARZEC 2005

WYDAWCZA:

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

KOMITET
REDAKCYJNY:

Redaktor naczelny
Stanisław Błażewicz

Sekretarz redakcji,
Skład komputerowy
Augustyn Powroźnik

RADA
NAUKOWA:

**Jan Ryszard
Dąbrowski**

Jan Chłopek

Tadeusz Cieślik

**Monika Gierzyńska-
Dolna**

Andrzej Górecki

Wojciech Maria Kuś

Jan Marciniak

Stanisław Mazurkiewicz

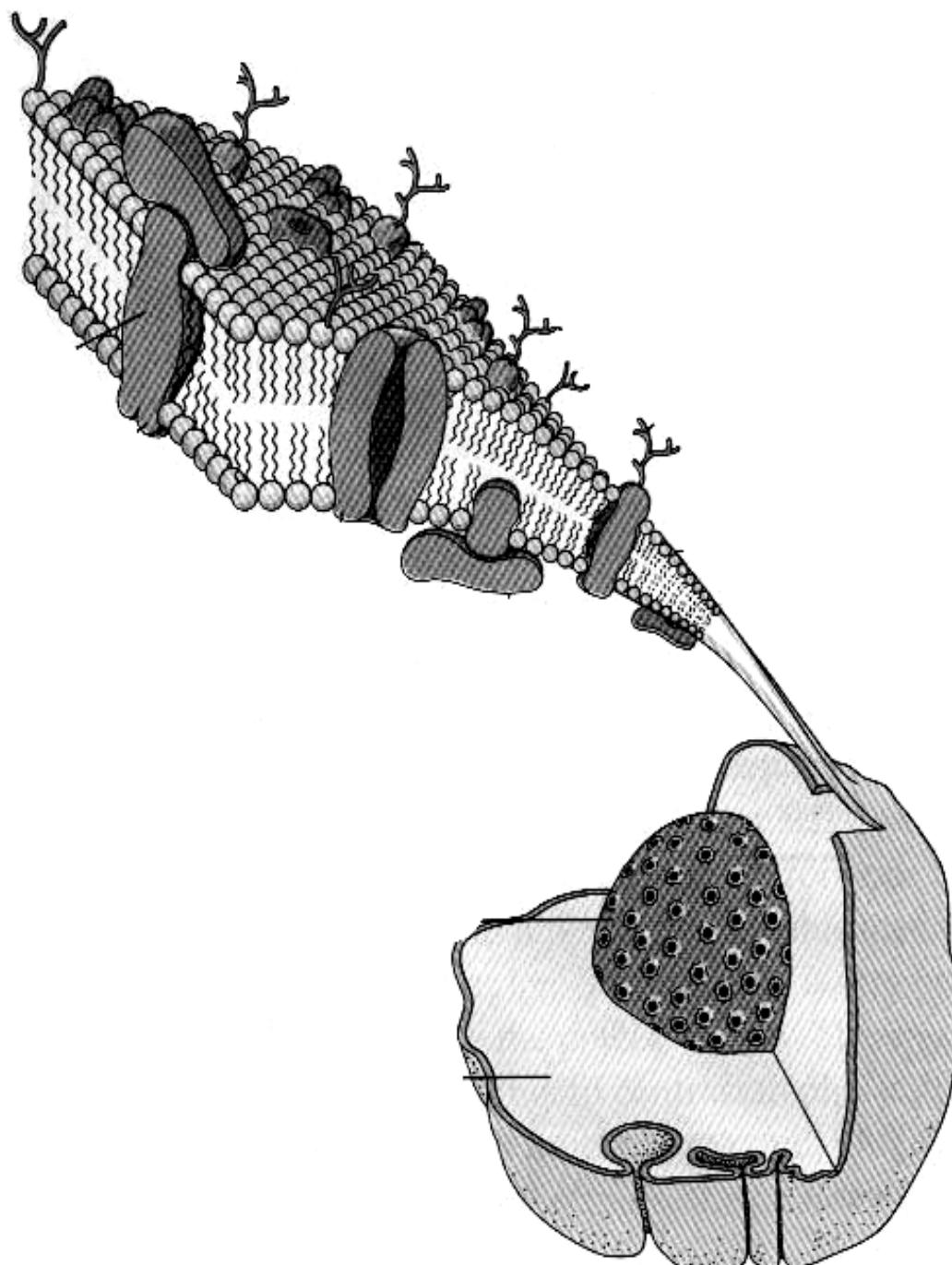
Stanisław Mitura

Roman Pampuch

**Bogna Pogorzecka-
Stronczak**

ADRES REDAKCJI:

Akademia
Górniczo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków



I N Z Y N I E R I A

..... **BIMATERIAŁÓW**

SPIS TREŚCI

NOWE BIODEGRADOWALNE MATERIAŁY OPARTE NA PLAZMOWEJ MODYFIKACJI SKROBI	5
M. KACZMAREK, H. SZYMANOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN, L. KLIMEK, B. WOŹNIAK, J. JÓZWIAK	
EMISJA POLOWA Z POWIERZCHNI WARSTW DLC NANIESIONYCH PRZY UŻYCIU METODY RFPCVD NA PODŁOŻA KRZEMOWE	9
A. KARCZEMSKA, D. JARZYŃSKA, M. DŁUŻNIEWSKI, E. STARYGA	
PŁYTKI KRWI W KONTAKCIE ZE STOPREM TYTANU Ti6Al4V I Z JEGO ZMODYFIKOWANYMI POWIERZCHNIAMI	13
W. OKRÓJ, L. KLIMEK, P. KOMOROWSKI, B. WALKOWIAK	
PRZYGOTOWANIE BIOSENSORA SPR, PRACUJĄCEGO W REALNYM CZASIE, DO BADANIA ODKŁADANIA SIĘ BIAŁEK NA POWIERZCHNI TYTANU I NA WARSTWACH NCD	16
M. KAMIŃSKA, J. SZYMAŃSKI, B. WALKOWIAK	
WZROST KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NA POWIERZCHNI WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW	21
H. JERCZYŃSKA, P. BARAŃSKA, W. KOZIOŁKIEWICZ, B. WALKOWIAK, Z. PAWŁOWSKA	
BADANIA WARSTW WĘGLOWYCH WYTWARZONYCH NA STOPACH MAGNEZU METODĄ PACVD	24
M. GOŁĄBCZAK, P. COUVRAT	
WYTWARZANIE WARSTW WĘGLOWYCH W NOWYM REAKTORZE MW/RF	
W. KACZOROWSKI, P. NIEDZIELSKI, S. MITURA	28
WARSTWY DWUTLENKU TYTANU NAKŁADANE METODĄ CVD WSPOMAGANĄ PLAZMOWO DO ZASTOSOWAŃ FOTOKATALITYCZNYCH	32
H. SZYMANOWSKI, A. SOBCZYK, W. JAKUBOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN	

Streszczone w *Applied Mechanics Reviews*
Abstacted in *Applied Mechanics Reviews*

CONTENTS

NEW BIODEGRADABLE MATERIAL BASED ON RF PLASMA MODIFIED STARCH	5
M. KACZMAREK, H. SZYMANOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN, L. KLIMEK, B. WOŹNIAK, J. JÓZWIAK	
FIELD EMISSION FROM THE SURFACE OF DLC FILMS DEPOSITED BY RF PCVD METHOD ON SILICON SUBSTRATE	9
A. KARCZEMSKA, D. JARZYŃSKA, M. DŁUŻNIEWSKI, E. STARYGA	
BLOOD PLATELETS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY Ti6Al4V AND WITH ITS MODIFIED SURFACES	13
W. OKRÓJ, L. KLIMEK, P. KOMOROWSKI, B. WALKOWIAK	
PREPARATION OF REAL TIME SPR-BIOSENSORS FOR STUDY OF PROTEIN DEPOSITION AT TITANIUM AND NCD SURFACES	16
M. KAMIŃSKA, J. SZYMAŃSKI, B. WALKOWIAK	
GROWTH OF ENDO-THELIAL CELLS ON SURFACES OF SELECTED BIOMATERIALS	21
H. JERCZYŃSKA, P. BARAŃSKA, W. KOZIOŁKIEWICZ, B. WALKOWIAK, Z. PAWŁOWSKA	
INVESTIGATIONS OF CARBON LAYERS MANUFACTURED ON MAGNESIUM ALLOYS USING PACVD METHOD	24
M. GOŁĄBCZAK, P. COUVRAT	
MANUFACTURE OF CARBON COATING FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS IN A NEW MW/RF REACTOR	
W. KACZOROWSKI, P. NIEDZIELSKI, S. MITURA	28
PLASMA ENHANCED CVD DEPOSITION OF TITANIUM DIOXIDE FILMS FOR PHOTOCATALYTIC APPLICATIONS	32
H. SZYMANOWSKI, A. SOBCZYK, W. JAKUBOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN	

Wydanie dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych
Edition financed by State Committee for Scientific Research

OBSERWACJE ZAMIAN MIKROSKOPOWYCH CEWNIKÓW TYPU DOUBLE-J W ZALEŻNOŚCI OD CZASU UTRZYMYWANIA ICH W DROGACH MOCZOWYCH	36	MICROSCOPIC INVESTIGATION OF DOUBLE-J CATHETERS DEPENDING ON THE LENGTH OF THEIR PRESENCE IN THE URINARY TRACT	36
L. KLIMEK, W. RÓŻAŃSKI, Z. JABŁONOWSKI, M. SOSNOWSKI, R. KLIŚ		L. KLIMEK, W. RÓŻAŃSKI, Z. JABŁONOWSKI, M. SOSNOWSKI, R. KLIŚ	• • • • 3
BUDOWA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA WARSTW AZOTKU I WĘGLIKO-AZOTKÓW TYTANU NA STOMATOLOGICZNYM STOPIE WIRONIT	40	STRUCTURE AND CORROSION RESISTANCE OF THE TITANIUM NITRIDES AND NITROCARBIDES LAYERS ON THE WIRONIT DENTAL ALLOY	40
L. KLIMEK		L. KLIMEK	
MIKROSKOPOWA OCENA ZUŻYCIA POWIERZCHNI CEWNIKÓW DOTĘTNICZYSTYCH	43	MICROSCOPE EVALUATION OF ARTERIAL CANNULA EROSIVE WEAR	43
L. KLIMEK, W. MACHAŁA		L. KLIMEK, W. MACHAŁA	
MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA ELEKTRONOWEGO MIKROSKOPU SKANINGOWEGO W BADANIACH MATERIAŁÓW STOMATOLOGICZNYCH	47	POSSIBILITIES OF SCANING ELECTRON MICROSCOPE APPLICATION FOR STOMATOLOGICAL AND ORAL SURGICAL MATERIAL INVESTIGATIONS	47
L. KLIMEK, J. SOKOŁOWSKI, M. KOZAKIEWICZ, M. ŁĘSKI, K. BANASZEK		L. KLIMEK, J. SOKOŁOWSKI, M. KOZAKIEWICZ, M. ŁĘSKI, K. BANASZEK	
MODYFIKACJE POWIERZCHNI IMPLANTÓW METALICZNYCH	52	SURFACE MODIFICATIONS OF METALLIC IMPLANTS	52
I. PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ, W. OKRÓJ, B. WALKOWIAK		I. PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ, W. OKRÓJ, B. WALKOWIAK	
ZMIANY POJEMNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ FIBROBLASTÓW PO KONTAKCIE Z WYBRANYMI BIOMATERIAŁAMI	63	HANGES IN AN ANTI-OXIDATIVE CAPACITY OF FIBROBLAST DUE TO A CONTACT WITH SELECTED BIOMATERIALS	63
J. MAJAK, W. JAKUBOWSKI, A. BALCERCZYK, P. NIEDZIELSKI, B. WALKOWIAK		J. MAJAK, W. JAKUBOWSKI, A. BALCERCZYK, P. NIEDZIELSKI, B. WALKOWIAK	
ZASTOSOWANIE BIOMATERIAŁÓW Z WARSTWAMI WĘGLOWYMI DO PRZEKŁUWANIA CIAŁA	66	APPLICATION OF BIOMATERIALS WITH CARBON COATINGS FOR BODY PIERCING	66
D. BOCIĄGA, J. GRABARCZYK, P. NIEDZIELSKI, M. KRAKOS, K. MITURA		D. BOCIĄGA, J. GRABARCZYK, P. NIEDZIELSKI, M. KRAKOS, K. MITURA	
HAMOWANIE PROCESU HEMOLIZY W OBECNOŚCI PROSZKU DIAMENTOWEGO W WARUNKACH USZKODZENIA PRZEZ WOLNE RODNIKI	70	THE INHIBITION OF HAEMOLYSIS IN PRESENCE DIAMOND POWDER PARTICLES IN CONDITIONS OF FREE RADICAL DAMAGE	70
K. MITURA, G. BARTOSZ, S. MITURA		K. MITURA, G. BARTOSZ, S. MITURA	
WETTABILITY OF AS-DEPOSITED AND IMPLANTED TETRAHEDRAL CARBON FILMS	74	WETTABILITY OF AS-DEPOSITED AND IMPLANTED TETRAHEDRAL CARBON FILMS	74
O.M. KUTSAY, O.I. KAPLUNENKO, A.G. GONTAR, O.B. LOGINOV, V.M. PEREVERTAILO, N.V. NOVIKOV, W.Y. LUK, Y. LIFSHITZ, I. BELLO, S.T. LEE		O.M. KUTSAY, O.I. KAPLUNENKO, A.G. GONTAR, O.B. LOGINOV, V.M. PEREVERTAILO, N.V. NOVIKOV, W.Y. LUK, Y. LIFSHITZ, I. BELLO, S.T. LEE	

4 PREFACE

The 2nd Summer School, organized by the Centre of Excellence NANODIAM, was devoted to "Biomedical Application of Carbon Surfaces", and was a strict continuation of the 1st Summer School focused on "Technology of Carbon Surfaces" (see the Engineering of Biomaterials, 35-36, 2004). The school took place in Łódź and Wysowa, Poland, between September 21st and 25th, 2005. An innovative research conducted by the Centre of Excellence NANODIAM, in cooperation with its scientific partners, and the newest technical and biomedical solutions have made the number of people interested in the school exceeded the expectations. Finally 58 school participants have had to listen to 15 lectures, delivered by experts from abroad and from Poland.

The school was begun on Tuesday, September 21st, 2004, in the building of the International Faculty of Engineering, at the Technical University of Łódź. The Rector of the Technical University of Łódź, Professor Jan Krysiński, has opened the 2nd Summer School, and the inaugural lecture, entitled: "Inflammatory processes and immune reactions associated with implant use", was gave by the former president of European Society for Biomaterials Professor Peter Revell, from Royal Free and University College Medical School in London, UK. The speech provoked numerous questions and discussion, which was continued during the lunch and trip to Wysowa.

On Wednesday, September 22nd, 2004, the morning session was started by the lecture entitled "Blood platelets physiology - a general overview", delivered by Professor Stan Heptinstall, from the University Hospital Queen's Medical Centre, Nottingham, UK. The next speech: "Blood platelet response to contact with implant surface" was conducted by Professor David Grant, from the School of Mechanical, Materials and Manufacturing Engineering, University of Nottingham, UK. After a coffee break, Professor Hieronim Bartel, from the Medical University of Łódź, Poland, presented lecture: "Cellular and molecular aspects of bone remodeling", and once more Professor Peter Revell had a speech: "Bioactivity of materials in bone". The evening session was a place of two lectures delivered by representatives of the others polish research institutions: Doctor Zbigniew Nawrat, from the Medical University of Silesia, Katowice, - "NCD application in cardiovascular surgery" and Professor Jacek Moll, from the Polish Mother's Memorial Hospital, Research Institute, Łódź - "Implants for cardiovascular surgery". In the end, during the summary, all the speakers answered the questions asked by the participants.

The next day of the school (September 23th, 2004) had a little bit less medical, but more biomedical nature. A several lectures were delivered by scientists - experts at the

biological and physical domain: Professor Zofia Pawłowska, from Medical University of Łódź, Poland, has spoken about: "Detection of changes in cellular proteins profile: proteomics aspects", and Professor Bogdan Walkowiak, from Technical University of Łódź, Poland, presented: "Potential risk associated with an implant use". Professor Anna Kessling, from North West Thames Regional Genetics NHS Service, UK, delivered the lecture: "How can genes change micro-architecture in the heart", Doctor Dimitrios Sideris, from Imperial College, London, UK, talked about: "Protein separation technology and the importance of diamond coatings", and Professor Marcel Zitnansky, from Slovak University of Technology in Bratislava and Faculty of Materials Science and Technology in Trnava, Slovakia, had the speech: "The metamorphosis of transformation from solids to liquids and from liquids to solids still is area of rapid Proto Typing". In the evening the poster session took place, where 27 posters were presented. Both abstracts an posters' photos are available at: www.p.lodz.pl/NANODIAM. We have found the presented posters as a very interesting and stimulating, and it was confirmed by a fruitful discussion during the session.

The last day of the school (September 24th, 2004), was started by Professor Peter Spangenberg, from University of Applied Science in Jena, Germany, with presentation: "Biomedical Engineering Faculty at University of Applied Science in Jena". The next lecture: "Diamond biocompatibility" was delivered by Professor Stanisław Mitura and Doctor Katarzyna Mitura, both from Technical University of Łódź. The industry was represented by MEDGAL company, Białystok, Poland, by presentation about offered implants and process of implant production.

On Saturday, September 25th, 2004, all the school participants returned to Łódź, where the 2nd Summer School has been closed.

The 2nd Summer School was devoted to carbon surfaces - especially to their biomedical application, but several delivered lectures focused attention on technology of carbon surface as well. This thematic combination and presentation of its practical application had a measurable advantages for students to the largest degree but also for all gathered experienced scientists. In this latter case it was very important taking into consideration the newest direction of researchers' development, which join various areas of science. For PhD students this Summer School was a great opportunity to learn, to exchange experiences, remarks, to discuss and share their achievements with the others young scientists. The best time for that was a poster session, when they had presented results of their work in the form of posters. The most interesting papers presented during this poster session were selected and are included into the current issue of the Engineering of Biomaterials.

Łódź, March 3rd, 2005

Bogdan Walkowiak

NOWE BIODEGRADO-WALNE MATERIAŁY OPARTE NA PLAZMOWEJ MODYFIKACJI SKROBI

MARIUSZ KACZMAREK*, HIERONIM SZYMANOWSKI*, MACIEJ GAZICKI - LIPMAN*, LESZEK KLIMEK*, BOGUSŁAW WOŹNIAK**, JACEK JÓZWIAK**

*INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, ŁÓDŹ, POLSKA

**INSTYTUT PRZEMYSŁU SKÓRZANEGO, ŁÓDŹ, POLSKA

Streszczenie

Praca ta przedstawia zastosowanie skrobi ziemniaczanej jako napełniacza w celu wytworzenia materiałów kompozytowych z wysokiej gęstości polietylenem. Należy przypuszczać, że nastąpi poprawa mieszalności skrobi z polietylenową matrycą, po procesie modyfikacji skrobi i jej powierzchnia stanie się bardziej hydrofobowa. W tym celu został zastosowany obrotowy reaktor plazmowy w.cz. do powierzchniowej modyfikacji ziaren skrobi.

Reaktor w.cz. jest układem pojemnościowo sprzężonym, wykorzystującym zewnętrzne elektrody i metan (CH_4) jako gaz roboczy. Pomiary wysokości kapielarnego wzniesienia wody były wykonane w celu oceny właściwości hydrofilowych powierzchni ziaren. Skrobia po modyfikacji w wyładowaniu jarzeniowym z użyciem metanu, posiada znaczną zmianę właściwości powierzchniowych, które są bardziej hydrofobowe - proces modyfikacji potrafi kilkukrotnie obniżyć efekt kapielarnego wzniesienia cieczy.

Słowa kluczowe: skrobia ziemniaczana, procesy plazmowe, hydrofobizacja, polietylen, materiały kompozytowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 5-8]

Wprowadzenie

Odpady polimerowe stanowią obecnie duży ekologiczny problem. Istotną ich część stanowią jednorazowe materiały opakowaniowe posiadające bardzo długi czas rozkładu, szacowany na setki lat. W takich okolicznościach, poszukiwania materiałów ulegających biodegradacji są w pełni uzasadnione. Jednym z możliwych rozwiązań jest zastosowanie materiałów kompozytowych. W takich kompozytach biodegradowalne napełniacze takie jak skrobia mogą być użyte jako wypełniacz matrycy wykonanej z typowych polimerów takich jak polietylen czy polipropylen [1]. Jednakże pojawią się pewien problem z wykonaniem takich kompozytów. A mianowicie poliolefiny posiadają bardzo niską składową polarną energii powierzchniowej i nie zwilżają w sposób wystarczający powierzchni ziaren skrobi, charakteryzujących się stosunkowo wysoką składową polarną energii powierzchniowej. Oczyszczonym rozwiązaniami jest obniżenie energii powierzchniowej na granicy faz polimer/skrobia [2]. Jedną z dróg realizacji tego procesu jest obniżenie części składowej polarnej energii powierzchniowej skrobi. Procesy plazmy niskotemperaturowej są od dawna używane w celu modyfikacji powierzchni polimerów. Trudności modyfikacji materiału użytego jako napełniacz są związane z jego stosunkowo dużym

NEW BIODEGRADABLE MATERIAL BASED ON RF PLASMA MODIFIED STARCH

.....
5

MARIUSZ KACZMAREK*, HIERONIM SZYMANOWSKI*, MACIEJ GAZICKI - LIPMAN*, LESZEK KLIMEK*, BOGUSŁAW WOŹNIAK**, JACEK JÓZWIAK**

*INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, ŁÓDŹ, POLAND

**LEATHER RESEARCH INSTITUTE, ŁÓDŹ, POLAND

Abstract

The work presents an application of potato starch as a filler in a fabrication of a composite material with high density polyethylene. It had been assumed that, in order to improve miscibility of starch with polyethylene matrix, its surface should be made more hydrophobic. Therefore, radio frequency plasma rotary reactor has been applied to the surface modification of grains of starch.

The RF system is capacitively coupled, it utilizes external electrodes and methane (CH_4) is used as working medium. Measurements of a height of water capillary rise have been applied to assess the hydrophilic properties of the grain surface. Starch, when modified with methane RF glow discharge, possesses considerably altered surface properties, being more hydrophobic - the modification process is able to lower capillary rise effect several times.

Key words: potato starch, plasma processing, hydrophilicity, polyethylene, composite.

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 5-8]

Introduction

Polymer wastes constitute today a large ecological problem. A substantial part of them is comprised of disposable packaging materials, having very long composting times that are counted in year-hundreds. Under these circumstances, a search for materials of a much better biodegradability is underway. One of the possible approaches concerns a use of composite systems. In such systems, biodegradable fillers, such as starch, can be used to fill out a matrix made of typical thermoplastic polymers, such as polyethylene or polypropylene [1]. There is, however, one major problem with these composites. A polyolefins, with a very low polar component of its surface energy, does not sufficiently wet the surface of starch grains, characterized with a relatively high polar component. An obvious solution is a minimization of the surface energy of the interface polymer/starch [2]. One way to realize this process is to lower the polar component of surface energy of starch. Low temperature plasma processes have been long used to modify polymer surfaces [3-5]. A difficulty with the modification of a material used as a filler is its high surface to volume ratio. Particularly, the modification of starch requires a plasma system able to work with substrates in a highly particulate form. Fluidal bed plasma reactor constitutes one possibility[6]. Another one comprises all solutions, in which the powdered substrate is set in motion, either vibration or rotation.

rozdrobnieniem [3-5]. A więc modyfikacja skrobi wymaga specjalnego plazmowego systemu mogącego pracować z materiałami będącymi w wysokim stopniu rozdrobnienia[6].

Niniejsza praca przedstawia zastosowanie obrotowego reaktora w.cz do plazmowej modyfikacji ziaren skrobi przy użyciu metanu jako gazu roboczego.

Zmodyfikowana skrobia tym sposobem, wykazuje znaczną poprawę właściwości powierzchniowych. Pomiary kapilarnego wznieśienia wody były wykonane w celu oceny stopnia zwilżania ziaren skrobi. Wyniki badań wykazały, że zastosowane procesy modyfikacji mogą obniżyć ten efekt kilkakrotnie.

Zmodyfikowana skrobia, była użyta jako napełniacz w celu wykonania materiałów kompozytowych z polietylenem. Zostały również wykonane badania wytrzymałościowe materiałów kompozytowych a mianowicie: wytrzymałość na rozciąganie, wydłużenie przy zerwaniu i moduł Younga. Uzyskane wyniki badań pokazują znaczną poprawę tych parametrów w porównaniu z polietylenem napełnionym skrobią niemodyfikowaną.

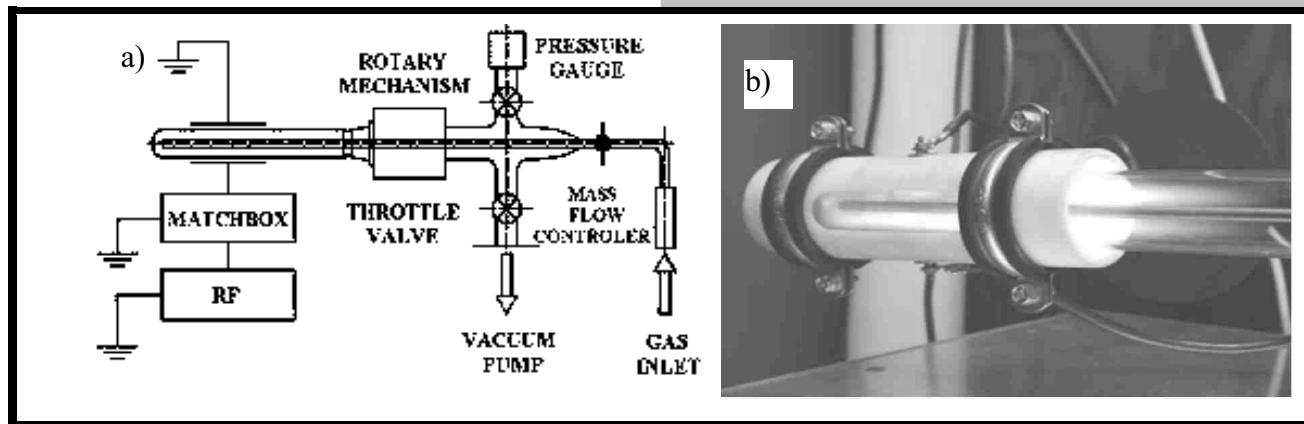
The present work reports an application of radio frequency plasma rotary reactor to the surface modification of grains of starch, using methane as a working medium.

Modified in this manner, starch possesses considerably altered surface properties. Measurements of the height of water capillary rise were used to assess the moistening effect of grain surface. It has been shown that the applied modification process is able to lower this effect several times.

Starch, modified in such a way, has been used as a filler to prepare composite materials with polyethylene. Tensile strength, elongation on break and Young modulus of the composites have been measured. Results show a substantial improvement of these parameters compared with polythene filled with unmodified starch. In addition, other properties of the composite, such as their DSC characteristic, are also presented.

Experimental

Plasma processing of starch grains was carried out with the help of a rotating RF plasma reactor. The schematic



RYS. 1. Schemat plazmowego obrotowego reaktora w.cz. (a), reaktor podczas pracy (b).
FIG. 1. Schematic representation of the rotating RF plasma reactor (a), the reactor at work (b).

Część doświadczalna

Plazmowa modyfikacja ziaren skrobi była wykonana przy pomocy obrotowego reaktora plazmowego w.cz. Schemat tego reaktora przedstawiony jest na RYS. 1. Głównym elementem tego reaktora jest jego komora, szklana rura o długości 450 mm, średnicy 40 mm, która może obracać się z częstotliwością z zakresu od 0 do 60 obr./min.

Głównym celem procesu modyfikacji jest hydrofobizacja powierzchni ziaren skrobi, tj. znaczne zmniejszenie jej zwilżalności. Ocena efektywności zwilżania określana jest poprzez pomiar kapilarnego wznieśienia wody w szklanej kapilarze (o średnicy 1.8 mm) napełnionej skrobią.

Wyniki badań

Hydrofobizacja

Pomiary maksymalnego kapilarnego wznieśienia cieczy dla skrobi niemodyfikowanej wyniosły w przybliżeniu ok. 60 mm. Na RYS. 2 pokazane są wyniki kapilarnego wznieśienia wody dla skrobi modyfikowanej przy przepływie metanu równym 2 sccm i 6 sccm. Modyfikacja ziaren skrobi przy użyciu metanu znacznie obniża maksymalne, kapilarne wznieśienie wody dla tych ziaren.

view of this reactor is presented in FIG. 1. The major part of this reactor is a chamber, 450 mm long tubular element, 40 mm diameter, that may be rotated with frequency ranging from 0 to 60 RPM.

The main aim of the modification process is a surface hydrophobization of starch, i.e. a substantial decrease of its water contact angle. Therefore, an assessment of the process efficiency is comprised of measurements of capillary rise of water in glass tubes (1.8 mm in diameter) filled with starch.

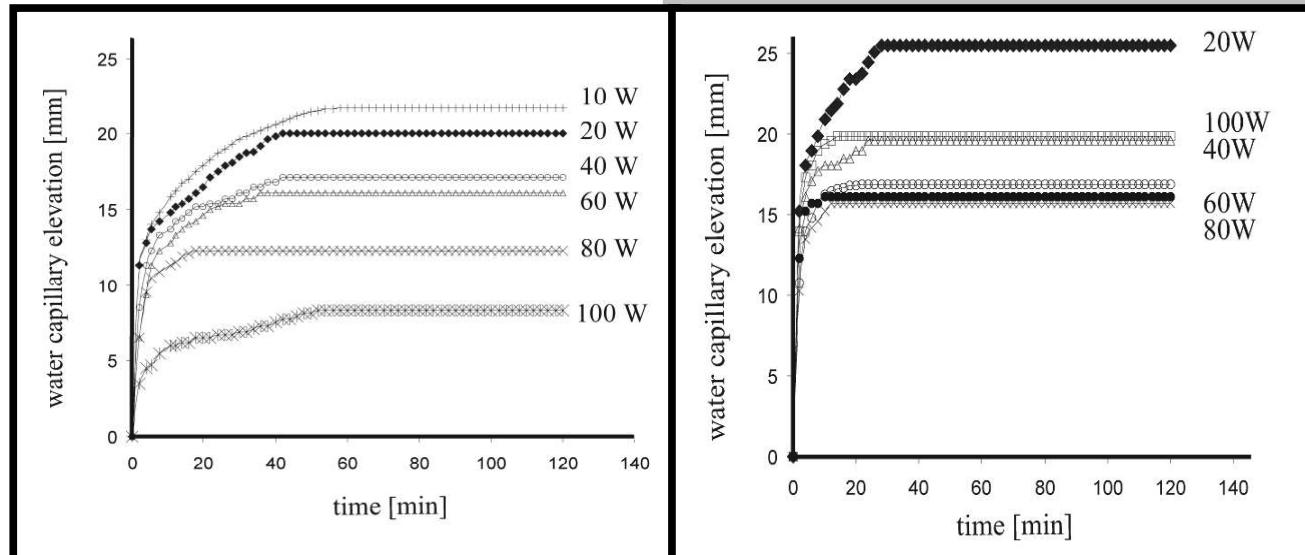
Results

Hydrophobization

The measured maximum water capillary elevation for native starch exhibits approximately 60 mm. FIG. 2 presents results of water capillary elevation, for starch modified with methane plasma at the flow rate of methane equal 2 sccm and 6 sccm. As seen in the figures, modification of starch grains with methane plasma substantially decreases the maximum water capillary elevation by these grains.

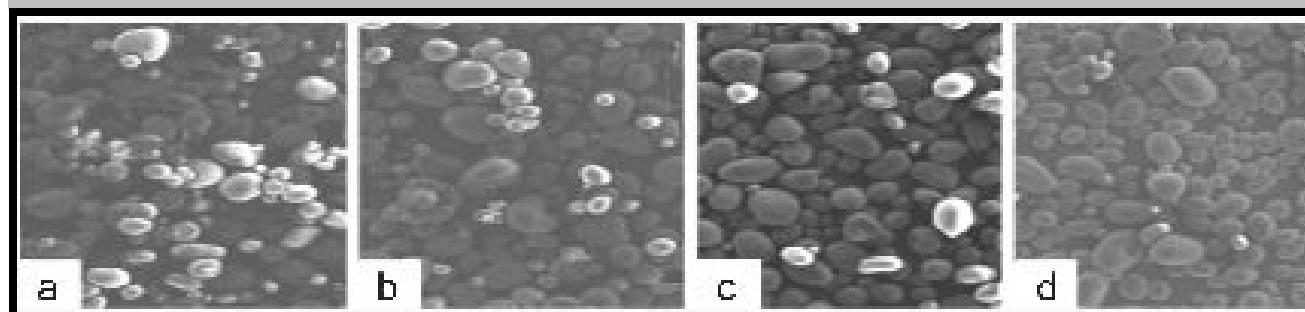
As seen in the micrographs, the unmodified starch grains have a tendency towards agglomeration (FIG. 3a). Plasma modification of its grains reduces this tendency substantially (FIGs. 3b, 3c and 3d).

Composite materials with PE as a matrix and starch (both unmodified and modified with methane plasma) have been



RYS. 2. Wyniki pomiarów kapilarnego wzniesienia wody dla skrobi modyfikowanej przy przepływie metanu 6 sccm (a) i 2 sccm (b).

FIG. 2. Results of capillary elevation measurements for starch modified with methane plasma at the flow rate of 6 sccm (a), at the flow rate of 2 sccm (b).

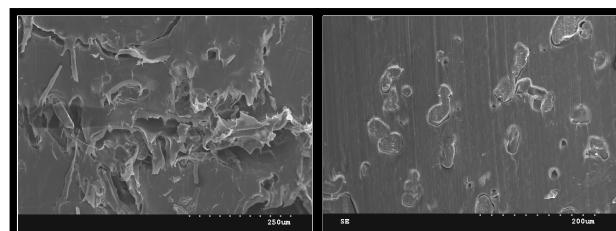


RYS. 3. Obrazy mikroskopowe SEM ziaren skrobi: niemodyfikowanej (a), modyfikowanej przy użyciu metanu i różnych moc wyładowania w.cz: 20 Wat (b), 100 Wat (c), 40 Watt (d). Przepływ metanu wynosił 6 sccm.

FIG. 3. SEM micrographs of starch grains: unmodified (a), and modified with methane plasma at different RF power values: 20 Watt (b), 40 Watt (c), 100 Watt (d). Flow rate of methane equal 6 sccm.

Jak widać na fotografiach (RYS. 3a), ziarna skrobi niemodyfikowanej mają tendencję do tworzenia aglomeratów. Plazmowa modyfikacja tych ziaren znacznie redukuje tą tendencję (RYS. 3b,c,d).

Materiały kompozytowe oparte na matrycy polietyleno-



RYS. 4. Obrazy mikroskopowe SEM przekrojów kompozytów polietylen/skrobia wykonanych z niemodyfikowanej skrobi (a) i skrobi modyfikowanej przy użyciu metanu z przepływem 6 sccm i mocy wyładowania 100 Wat (b).

FIG. 4. SEM micrographs of cross-sections of composite polyethylene/starch material prepared from unmodified starch (a), and from starch modified with methane plasma at the flow rate of methane 6 sccm and RF power of 100 Watt (b).

prepared by means of extrusion. FIG. 4 presents SEM micrographs of the cross-section of these materials. Not only are the grains of starch much more uniformly distributed in the matrix when they are plasma modified, but, first of all, they have remained in the matrix in the preparation process of the cross-section (see FIG. 4b). This is an indication of a partial formation of an interphase between polyethylene matrix and starch filler.

An existence of the interphase can also explain results of mechanical tests. Mechanical properties of PE filled with 15 % of starch, both unmodified and methane plasma modified, are presented in the table below. As seen in the table, all strength parameters are considerably higher for samples containing modified starch.

Also DSC measurement, presented in FIG. 5, reveals a presence of interphase between the grains of starch and the polythene matrix. All endothermic minima above 143°C do not exist in the samples containing unmodified starch. Their presence is very likely connected with various phase transformations of this interphase.

Conclusions

1. RF plasma modification of potato starch may be effectively carried out in a rotating plasma reactor, presented

Rodzaj kompozytu Type of composite material	Maksymalne naprężenie Maximum stress [Mpa]	Wydłużenie przy zerwaniu Elongation at break [%]	Maksymalne wydłużenie Maximum elongation [mm]
polietylen + skrobia niemodyfikowana polyethylene + unmodified starch	5.90	9.30	4.66
polietylen + skrobia modyfikowana przy użyciu metanu polyethylene + starch modified with methane plasma	7.04	16.6	8.33

TABELA 1. Porównanie właściwości mechanicznych materiałów kompozytowych zawierających niemodyfikowaną i modyfikowaną skrobię.

TABLE 1. Comparison of mechanical properties composite material with unmodified starch and modified starch.

wej i skrobi (zarówno niemodyfikowanej jak i modyfikowanej przy użyciu metanu) zostały wykonane metodą wytłaczania. RYS. 4 przedstawia obrazy mikroskopowe SEM przekrojów poprzecznych materiałów kompozytowych.

Ziarna skrobi zmodyfikowanej są równomiernie rozmieszczone w całej objętości kompozytu oraz nie wykruszają się z matrycy polietylenowej po wykonaniu przekrojów (RYS. 4b). Jet to oznaką wytworzenia się oddziaływań adhezyjnych pomiędzy polietylenową matrycą i skrobią jako napełniciem.

Właściwości mechaniczne polietylenu napełnionego 15% skrobi, zarówno niemodyfikowanej jak i modyfikowanej przy użyciu metanu przedstawione są w TABELI 1. Jak widać, wszystkie parametry wytrzymałościowe są znacznie wyższe dla próbek zawierających skrobię modyfikowaną.

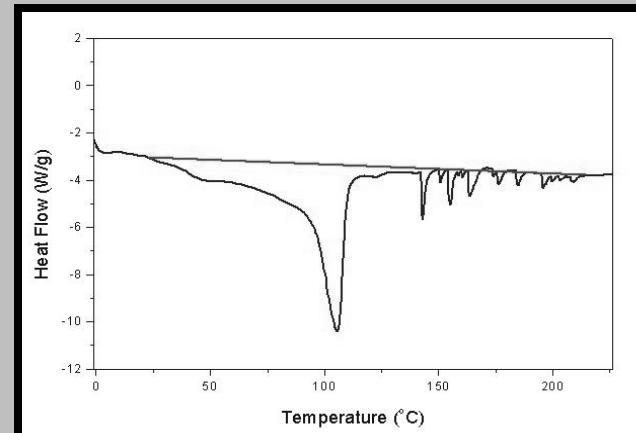
Również DSC, pokazane na RYS. 5, ujawniają obecność oddziaływanego pomiędzy ziarnami skrobi i matrycą polietylenową. Wszystkie endotermiczne minima powyżej 143°C nie występują w próbkach zawierających niemodyfikowaną skrobię. Ich obecność jest najprawdopodobniej związana z różnorodnym przetwarzaniem na granicy faz polietylen/skrobia.

Podsumowanie

1. Plazmowa modyfikacja skrobi ziemniaczanej może być skutecznie przeprowadzona w obrotowym reaktorze plazmowym, przedstawionym w niniejszej pracy.
2. Opisane procesy, stosujące modyfikację metanem, mogą być użyte jako procesy modyfikacji skrobi zapobiegające aglomeracji jej ziaren i poprawiające jakość mieszanek z polietylenem.
3. Polepszenie kompozytów polietylen/skrobia prawdopodobnie wynika z częściowego tworzenia się międzyfazy pomiędzy ziarnami skrobi i matrycą polietylenową.

Podziękowania

Prezentowana praca była finansowana przez Polski Komitet Badań Naukowych, numer projektu T 08 E 049 23.



RYS. 5. Wyniki pomiarów DSC dla kompozytu skrobia/polietylen. Endotermiczne minimum 105,5°C odpowiada matrycy polietylenowej.

FIG. 5. Results of DSC measurement for composite material starch/polyethylene The endothermic minimum at 105.5°C is due to

in this work.

2. The described process, with an application of methane plasma, may be used for such modification of starch that prevents agglomeration of its grains and improves the quality of its composites with polyethylene.
3. An improvement of polyethylene/starch composite is very likely due to a partial formation of an interphase between starch grains and polyethylene matrix.

Acknowledgements

This work has been supported by the Polish Committee for Scientific Studies (Komitet Badań Naukowych) under the project code T 08 E 049 23.

Piśmiennictwo

- [1] D.K. Owens, R.C. Wendt: *J. Appl. Polym. Sci.* 13, (1969), 1741.
- [2] A.W. Adamson: *Physical Chemistry of Surfaces*, Interscience Publishers INC., New York 1960.
- [3] C. Bamford, K. Al-Lamee: *Polymer* 37, (1996), 4885.
- [4] A. Nihlstrand, T. Hjertberg, K. Johanson: *Polymer* 38, (1997), 3581.
- [5] J. Gancarz, G. Poźniak, M. Bryjak: *Europ. Polym. J.* 35, (1999), 1419.
- [6] W.J. Van Ooij, A. Chityala: in: *Polymer Surface Modification; Relevance to Adhesion*, vol. 2 (K.L. Mittal, ed.), 234, VSP Utrecht, 2000.

References

EMISJA POLOWA Z PIERZCHNI WARSTW DLC NANIESIONYCH PRZY UŻYCIU METODY RFPCVD NA PODŁOŻA KRZEMOWE

A. KARCZEMSKA*, D. JARZYŃSKA**, M. DŁUŻNIEWSKI***,
E. STARYGA***

*INSTYTUT MASZYN PRZEPŁYWOWYCH, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
ANNAK@P.LODZ.PL

**INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
DJAR@P.LODZ.PL

***INSTYTUT FIZYKI, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, MDFIZ@P.LODZ.PL,
ESTARYGA@P.LODZ.PL

Streszczenie

Zbadano emisję polową elektronów dla cienkich warstw diamentopodobnych (DLC) poprzez pomiar prądu emisji w funkcji przyłożonego makroskopowego pola elektrycznego. Cienkie warstwy diamentopodobne naniesione na różne podłoża krzemowe przy użyciu techniki RF PCVD. Charakterystyki prądu emisji od napięcia, dla warstw DLC, zmierzono przy użyciu techniki wykorzystującej sondę anodową. Analiza zarejestrowanych wartości prądu emisji elektronów od napięcia dla badanych heterostruktur DLC/Si wskazuje, że w porównaniu z płaskim podłożem Si, podłoże krzemowe zaopatrzone w stożki zwiększa wydajność emisji polowej z powierzchni warstw DLC naniesionych na te podłożo.

Słowa kluczowe: emisja polowa, warstwy diamentopodobne, emitery krzemowe, RF PCVD

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 9-13]

Wstęp

Poznanie struktury warstw diamentopodobnych jest ważne dla zastosowań technologicznych tych warstw np. przygotowania ich do wykorzystania w przyrządach elektronicznych. W ostatnich latach zwiększyło się zainteresowanie materiałami węglowymi, między innymi warstwami diamentopodobnymi - DLC, z powodu dobrej zdolności tego materiału do polowej emisji elektronów. Warstwy diamentopodobne charakteryzują się ujemnym powinowactwem elektronowym [1], co sprawia, iż są one obiecującym materiałem mogącym znaleźć zastosowanie w wyświetlaczach FED. W warstwach DLC występuje znaczna przewaga zawartości tetraedrycznych wiązań C-C sp^3 w stosunku do zawartości trygonalnych wiązań C-C sp^2 . Z tego powodu warstwy te odznaczają się dużą twardością i stabilnością chemiczną, wysoką przewodnością termiczną, a także dobrą adhezją do różnorodnych podłoży. Z racji swoich właściwości, warstwy DLC stają się użyteczne w szerokim zakresie zastosowań, szczególnie jako materiał stanowiący pokrycie powierzchni krzemowych emiterów polowych.

Wydajna emisja polowa elektronów z warstw DLC może wynikać z tego, iż powierzchnia diamentu posiada samoistne ujemne lub bardzo małe dodatnie powinowactwo elektroniczne [2-5]. Opublikowane dotychczas prace dotyczące modeli emisji z warstw DLC prezentują szereg interesujących wyni-

FIELD EMISSION FROM THE SURFACE OF DLC FILMS DEPOSITED BY RF PCVD METHOD ON SILICON SUBSTRATE

...?...

A. KARCZEMSKA*, D. JARZYŃSKA**, M. DŁUŻNIEWSKI***,
E. STARYGA***

*INSTITUTE OF TURBOMACHINERY, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
ANNAK@P.LODZ.PL

**THE FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, TECHNICAL
UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, DJAR@P.LODZ.PL

***INSTITUTE OF PHYSICS, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
MDFIZ@P.LODZ.PL, ESTARYGA@P.LODZ.PL

Abstract

The electron field-emission properties of diamond-like carbon (DLC) thin films were examined by measuring the field-emission current as a function of applied macroscopic electric field. The thin diamond-like carbon films were deposited on various silicon substrates by using a RF PCVD technique. The field-emission characteristics of DLC coatings were investigated using an anode probe technique. The analysis of the registered values of the electron emission current to the voltage for the examined heterostructures DLC/Si indicates that in comparison with the flat Si substrate, the Si substrate with the pattern of cones contributes to the increase of the emission efficiency from the surface of DLC coatings deposited on these substrates.

Keywords: field emission, diamond-like carbon, silicon emitter, RF PCVD

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 9-13]

Introduction

The understanding of diamond-like carbon structure is important for their further technological applications, for instance for the fabrication of diamond-based electronic devices. During the last decade a number of carbon-based materials, including diamond-like carbon, have attracted the attention of the researchers for their excellent electron emission properties. Diamond and diamond-like carbon coatings show a negative electron affinity [1] and so DLC is the promising material for the field emission displays (FED) applications. Diamond-like carbon films are known to have a high ratio of tetrahedral C-C sp^3 bonds to trigonal C-C sp^2 bonds. As a result, they have extreme physical hardness, high resistivity, good adhesion to different substrates and are chemically inert. These properties make DLC the useful material for a wide variety of applications, especially as the coating material for the field emitters.

The significant electron emission from DLC coatings can be caused by the diamond surface low positive or negative electron affinity [2-5]. The papers concerning the field emission from DLC coatings, published so far, show many interesting results. However, the mechanism of electron emission from diamond films and diamond-like carbon films is still not entirely clear. Robertson [6] and Carey [7] indicate

BIO-MATERIAŁOWE

ków. Mechanizm emisji elektronów z warstw węglowych pozostaje jednakże ciągle niewyjaśniony. Robertson [6] i Carey [7] wskazują, że emisja elektronów jest zależna zarówno od koncentracji wiązań sp^2 i sp^3 , jak również od rodzaju stosowanych domieszek. Istnieje kilka modeli, które rozważają emisję elektronów z nanokrystalicznego diamentu [8] lub z materiału węglowego na granicy ziaren [9-11], które to modele wskazują, że inkluzje grafitowe w warstwie DLC mogą odgrywać istotną rolę w tworzeniu kanałów przewodzących elektryny.

Badania właściwości warstw DLC w płynach ustrojowych, wskazują, że materiał implantu pokryty taką warstwą wykazuje zwiększoną odporność na korozję [12]. Zbadanie stanu powierzchni warstw DLC pod względem zdolności do emisji elektronów oraz określenie pracy wyjścia z tego materiału ma istotne znaczenie dla zastosowań tego materiału w mikroelektronice próżniowej jak również w medycynie [13].

Część eksperymentalna

Warstwy diamentopodobne zostały wytworzone metodą RF PCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) w wyniku rozkładu metanu (CH_4) w plazmie w.cz. o częstotliwości 13,56 MHz. Proces nakładania warstw DLC na podłoża krzemowe odbywał się w dwóch etapach: 1) trawienie jonowe podłoża i 2) nanoszenie warstwy. Trawienie jonowe przeprowadzono przy potencjale autopolaryzacji -600V w ciągu 3 minut, w celu oczyszczania powierzchni podłoża Si. Nanoszenie warstw odbywało się przy zastosowaniu ujemnego potencjału autopolaryzacji elektrody w.cz. -300V. Czas osadzania warstwy DLC o grubości 20 nm wynosił 40 sekund. Ciśnienie gazu w komorze reaktora wynosiło około 26 Pa. Jako podłoża dla warstw DLC zastosowano krzem o parametrach podanych w TABELI 1.

Oznaczenie podłoża a Denotation of substrate	Orientacja Orientation	Typ przewodnictwa Type of conductivity	Rodzaj domieszki Kind of dope	Odporność właściwa Resistivity [Ωcm]	Dodatkowe informacje Additional information
A	<111>	n	P	< 0,002	
B	<100>	n	Sb	0,015 ± 0,023	
C	<100>	p	B	0,018 ± 0,020	
D	<100>	p	P	1 ± 3	
E		n	Sb	0,020	Na powierzchni Si wytworzono stożki przy użyciu litografii The cones fabricated by the method of Island Lithography on the Si surface

TABELA 1. Opis zastosowanych podłoży krzemowych.

TABLE 1. Specification of applied silicon substrates.

Na powierzchni podłoża Si (oznaczonego symbolem E) wytworzono przy użyciu litografii stożki o wysokości 200±300 nm i średnicy podstawy 150±200 nm (zdjęcie podłoża z warstwą DLC zamieszczono na RYS. 1). Podłoża krzemowe, przed nałożeniem warstwy DLC, dodatkowo oczyszczano przez 30s, w 10 % roztworze kwasu fluorowodorowego.

Charakterystyki emisjne badano w układzie zapewniającym próżnię rzędu $5 \cdot 10^{-5}$ Pa. Anodę stanowiła kulka ze stali nierdzewnej o średnicy 5 mm, a katodę stanowiła próbka. Odległość między anodą i katodą wynosiła 15 μm . Podczas badania emisji pomiędzy elektrodami przykładały napięcia z zakresu 100-3800 V.

Wyniki i dyskusja

Zjawisko emisji polowej elektronów z powierzchni opisuje teoria Fowler - Nordheima (FN) [14]. Model FN zakłada tunelowanie elektronów z poziomu Fermiego przez trój-

that the electron emission depends on both; the concentration of the bonds sp^2 and sp^3 and the kind of used donors. Several models have been proposed that consider the emission from diamond nanocrystals [8] or from non-diamond carbon material at the grain boundaries [9-11]. The models pointed out that the graphite inclusions embedded in the diamond-like carbon might play an important role for the contribution of electron conduction channels.

Examinations of DLC coatings properties in the body fluids indicate that DLC coated implant material shows the higher corrosion resistivity [12]. The examination of DLC coatings surface state with respect to the electron emission ability and the determination of the material's work function, is significant for applications of this material in vacuum microelectronics and also in medicine. [13].

Experimental part

Diamond-like carbon coatings were manufactured by RF PCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) method by the decomposition of methane in high-frequency plasma of 13,56 MHz under lowered pressure. The process of coatings deposition took place with two stages: 1) the ion etching of the substrate and 2) the coating deposition. The ion etching was carried out with the potential -600V within 3 minutes, with the aim of the cleaning of the Si substrate. The coating deposition took place with the negative bias voltage of RF electrode of -300V. The time of deposition of 20 nm thick DLC coating was 40 seconds. The gas pressure in the reactor chamber amounted to about 26 Pa. As the substrate for DLC coatings, the silicon with the parameters shown in the TABLE 1 was applied.

On the Si substrates surface (represented with symbol E) the cones with the height of 200±300 nm and the base diameter of 150±200 nm were fabricated by the method of Island Lithography (the picture of substrate with DLC film on FIG. 1). The silicon substrates, before the DLC coating deposition, were etched within 30s, in the 10% solution of hydrofluoric acid (HF).

Emission current measurements were carried out in the system providing the vacuum of order of 5×10^{-5} Pa. The field-emission properties of DLC films were investigated using a "sphere-to-plane" electrode configuration with a 5 mm diameter stainless-steel ball anode, with the distance of 15 μm from the surface of investigated films (cathode). During the emission measurements, the voltage of the range of 100-3800 V was applied between the electrodes.

Results and discussion

A classical explanation for electron field emission from surface is the Fowler-Nordheim (FN) [14] tunneling. The

kątną barierę potencjału do próżni. Natężenie prądu emisji elektronów może być wyrażone uproszczonym równaniem FN:

$$I = \frac{aA\beta^2 E^2}{\phi} \exp\left(\frac{-b\phi^{3/2}}{\beta E}\right) \quad (1)$$

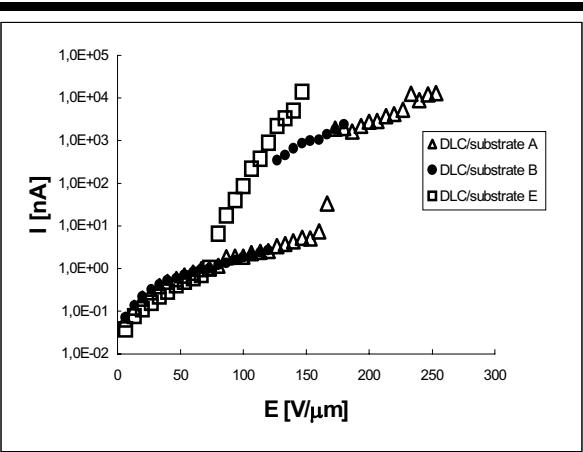
gdzie: I - natężenie prądu emisji , A - powierzchnia emitująca, ϕ - efektywna praca wyjścia, a, b - stałe: $a = 1,54 \cdot 10^{-6}$ eV·A·V⁻², $b = 6,83 \cdot 10^9$ eV^{-3/2} V⁻¹m⁻¹, E - natężenie pola elektrycznego, β - współczynnik kształtu elektrod.

RYS. 1. Zdjęcie powierzchni warstwy DLC o grubości 20 nm naniesionej na stożki wytwarzane przy użyciu litografii na podłożu krzemowym (podłoże oznaczone symbolem E).

FIG. 1. A picture of the DLC coating surface 20 nm thick, deposited on the cones fabricated by the method of Island Lithography on the silicon substrate (the substrate is represented by the symbol E).

RYSUNEK 2 przedstawia zależność natężenia prądu emisji od natężenia pola elektrycznego dla warstw DLC naniesionych na różne podłożka krzemowe. Dla warstw DLC naniesionych na gładkie (bez stożków) podłożka (oznaczone symbole A, B) zauważono wzrost prądu emisji przy natężeniu pola elektrycznego odpowiednio 160 V/ μ m i 120 V/ μ m, zaś dla warstw DLC naniesionych na podłożu z wytwarzonymi stożkami (oznaczonym symbolem E), wzrost prądu następuje przy niższej wartości natężenia pola, równej 80 V/ μ m. Z powierzchni warstw DLC naniesionych na podłożka krzemowe typu p (oznaczone symbolem C) oraz podłożka wysokooporowe typu n (oznaczone symbolem D) nie zarejestrowano emisji polowej elektronów.

Otrzymane wyniki przedstawiono w układzie FN na RYS. 3. Dla wyższych wartości natężenia pola elektrycznego zależności mają charakter liniowy. Z nachylenia prostych, na podstawie wzoru (1) obliczono efektywną pracę wyjścia j dla badanych warstw DLC. W obliczeniach założono, że współczynnik kształtu elektrod β jest równy 1. Dla warstw



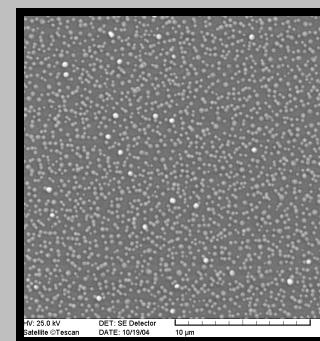
RYS. 2. Zależności natężenia prądu emisji od natężenia pola elektrycznego warstw DLC o grubości 20 nm, naniesionych na różne podłożka. Odległość pomiędzy katodą i anodą - 15 μ m. Przyjęto wartość $\beta = 1$, co odpowiada układowi płaskich elektrod.

FIG. 2. Electron field emission I-E characteristics for DLC films of the thickness 20 nm, deposited on various substrates (see TABLE 1). Cathode-anode distance - 15 μ m. The value of $\beta = 1$ was assumed, what corresponds to the flat electrodes configuration.

electrons tunnel from the Fermi level at the film surface through an approximately triangular potential barrier into the vacuum. An emission current can be described by the simplified FN equation:

$$I = \frac{aA\beta^2 E^2}{\phi} \exp\left(\frac{-b\phi^{3/2}}{\beta E}\right) \quad (1)$$

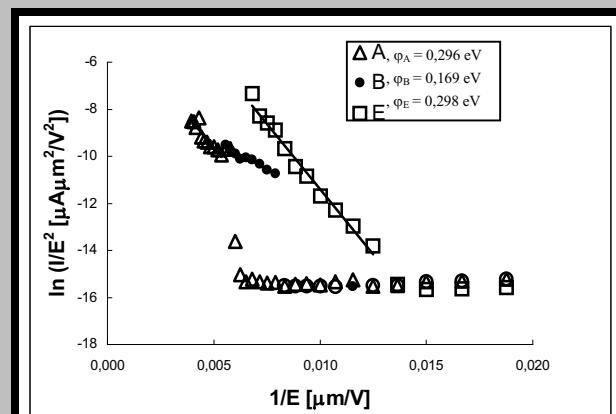
where: I - the emission current, A - the emitting area, ϕ - the effective work function of emitting surface, a, b - the constants: $a = 1,54 \cdot 10^{-6}$ eV·A·V⁻², $b = 6,83 \cdot 10^9$ eV^{-3/2} V⁻¹m⁻¹, E -



the applied electric field, β - the geometrical field enhancement factor.

FIGURE 2 shows the dependence of the emission current intensity to the electric field intensity for DLC coatings deposited on various silicon substrates. For the DLC coatings deposited on flat (without cones) substrates, represented by the symbols A,B, the significant increase of emission current with the intensity of electric field correspondingly 160 V/ μ m and 120 V/ μ m, was observed. For DLC coatings deposited on substrates with the fabricated cones (represented by the symbol E), the current increase occurs with the lower field intensity value, equal to 80 V/ μ m. The electron emission was not obtained from surfaces of DLC coatings deposited on the p-type silicon substrates (represented by the symbol C) and on high resistivity n-type substrates (represented by the symbol D).

The recorded I-V data from DLC specimen were used to generate the typical FN plot shown in FIG. 3. At high voltage the current shows the linear dependence, and the slopes of the curves (equation 1) were found to correspond to effective work function for a field enhancement factor β equal 1. For DLC coatings deposited on the substrates, represented by the symbols A, B and E, the values of the effective work function were determined: $\phi_A = 0,296$ eV; $\phi_B = 0,169$ eV; $\phi_E = 0,298$ eV. The theory indicates that the lower work



RYS. 3. Wykres Fowlera-Nordheima wykreślony na podstawie charakterystyk I-V dla warstw DLC o grubości 20 nm.

FIG. 3. The Fowler-Nordheim plot constructed from the I-V characteristic of DLC films.

DLC naniesionych na podłożą oznaczone symbolami A, B i E, otrzymano wartości efektywnej pracy wyjścia: $\phi_A = 0,296$ eV; $\phi_B = 0,169$ eV; $\phi_E = 0,298$ eV. Teoria wskazuje, że im mniejsza jest efektywna praca wyjścia elektronów, tym lepsze właściwości emisyjne posiada materiał. Uzyskane rezultaty trudno jest zinterpretować na obecnym etapie badań.

Przeprowadzone badania wskazują, że emisja elektronów z powierzchni warstw DLC jest zjawiskiem złożonym i zależnym od wielu czynników, m.in. od typu i rodzaju podłoża. Prąd emisji zarejestrowano dla warstw DLC naniesionych na niskooporowe podłożo krzemowe typu n o powierzchni gładkiej i powierzchni pokrytej wytworzonymi stożkami. Na tej podstawie można stwierdzić, iż rodzaj i typ krzemu zastosowanego jako podłożo dla warstwy DLC ma istotne znaczenie dla emisji elektronów z powierzchni warstw DLC.

RYS. 4. Zdjęcie powierzchni warstwy DLC z widocznymi zmianami struktury powierzchni powstałymi w wyniku emisji polowej z warstwy DLC.

FIG. 4. A picture of DLC coating surface with visible structure changes arose as a result of the field emission from DLC coating.

Po przeprowadzeniu badań emisji z warstw DLC zauważono na powierzchni badanych próbek nierówności oraz różnego typu kratery, które prawdopodobnie mogły pojawić się w wyniku topienia powierzchni katody. Nierówności znacznie zmodyfikowały powierzchnię próbki, co widoczne jest na RYS. 4.

W kilku przypadkach na powierzchni anody, po pomiarze prądu emisji, zaobserwowano fragmenty materiału wyrywane z powierzchni badanej próbki. Można więc przypuszczać, że zastosowanie wysokich napięć w czasie badania emisji może powodować zniszczenie powierzchni i zmiany strukturalne w warstwie DLC.

Wnioski

Przeprowadzone badania wskazują, że warstwy diamentopodobne, naniesione przy użyciu metody RF PCVD na wybrane i odpowiednio zmodyfikowane podłożo krzemowe, wykazują zdolność do emisji elektronów z powierzchni warstw DLC. Istotne znaczenie dla emisji elektronów ma wybór podłoża półprzewodnikowego, geometria jego powierzchni oraz rodzaj i koncentracja domieszki. Wyniki badań wskazują, że emisja elektronów z warstw DLC naniesionych na podłożo krzemowe charakteryzującą się obecnością stożków następuje przy znacznie niższych wartościach natężenia pola elektrycznego niż emisja z warstw naniesionych na gładkie podłożo krzemowe. Prawdopodobnie proces emisji elektronów do próżni może być kontrolowany także przez właściwości heterozłączca DLC/Si. Niewielkie wartości wyznaczonej efektywnej pracy wyjścia pozwalają sądzić, że badane warstwy DLC posiadają dobre właściwości emisyjne.

Podziękowania

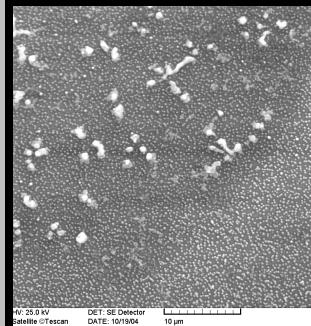
Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych (KBN) - projekt badawczy nr 3 T11B 050 26.

Prof. Mino Green z Imperial College UK dziękujemy za udostępnienie podłoży Si z wytworzonymi przy użyciu litografii stożkami.

function influences the better emission properties of the material. An interpretation of the obtained results is difficult for this stage of investigations.

Carried out investigations indicate that the electron emission from the surface of DLC coatings is the complex phenomenon and depends on many factors, for example on type of substrate. The emission current was registered for DLC coatings deposited on the low-resistivity, n-type silicon substrates with the flat and the cones fabricated surfaces. On this basis it is possible to state that the type of the applied silicon as the substrate for DLC coating has the significant importance for the electron emission from the surface of DLC coatings.

After emission, an examination of the DLC films with SEM showed protrusions and various types of



crater formation which may be due to the melting of the cathode surface. The protrusions greatly modify the surface morphology, as seen in FIG. 4.

In some cases, after the emission current measurement, the fragments of material pulled out from the sample surface were observed. It is possible to assume that the application of the high voltages during the field emission measurements can cause the surface damage and structural changes in the DLC coating.

Conclusion

Carried out investigations indicate that diamond-like carbon coatings deposited by the method of RF PCVD on silicon substrates show an ability to electron emission from the surface of DLC coatings. A choice of the semiconductor substrate, its surface geometry, a type and a dopant concentration have a significant meaning for the electron emission. Results of the investigation indicate that the electron emission from DLC coatings deposited on silicon substrates with the cones, begins the significantly lower values of the electric field intensity than the emission from the coatings deposited on flat silicon substrates. It is possible that the emission process to the vacuum could be controlled by properties of the heterostructure Si/DLC. Not high values of the determined effective work function allow to judge that the investigated DLC coatings possess good emission properties.

Acknowledgments

The work was financed by the Polish State Committee for Scientific Research (KBN) - project no. 3 T11B 050 26.

We would like to thank Prof. Mino Green from Imperial College of Science, Technology and Medicine of London, UK, that he made the Si substrates with the fabricated by Island Litography on their surfaces cones, available to us.

Piśmiennictwo

- [1] D.S. Mao, X.H. Liu, X. Wang, " Electron field emission from diamond-like carbon films and a patterned array by using a Ti interfacial layer", *J. Appl. Phys.*, 91 (2002) 3918-3922.
- [2] J.B. Cui, J. Ristein, L. Ley, "Low-threshold electron emission from diamond", *Phys. Rev.* 60 (2000) 16135-16142.
- [3] P.K. Baumann, R. J. Nemanich, "Negative electron affinity effects on H plasma exposed diamond (100) surfaces", *Diamond Relat. Mat.* 4 (1995) 802-805.
- [4] B.B. Pate, "The diamond surface: atomic and electronic structure", *Surf. Sci.*, 165 (1990) 83-142.
- [5] H. Kawarada, "Hydrogen-terminated diamond surfaces and interfaces", *Surf. Sci. Rep.*, 26 (1996) 205-259.
- [6] J. Robertson, "Amorphous carbon cathodes for field emission display", *Thin Solid Films* 296 (1997) 61-65.
- [7] J.D. Carey, R.D. Forrest, R.U.A. Khan, S.R.P. Silva, "Influence of sp₂ clusters on the field emission properties of amorphous carbon thin films", *Appl. Phys. Lett.*, 77 (2000) 2006-2008.
- [8] J. Robertson, Mechanism of electron field emission from diamond, diamond-like carbon, and nanostructured carbon", *J. Vac. Sci. Technol. B*17(1999) 659-665.

References 13

- [9] R.G. Forbes, "Low-macroscopic-field electron emission from carbon films and other electrically nanostructured heterogeneous materials: hypotheses about emission mechanism", *Solid-State Electronics* 45 (2001) 779-808.
- [10] N.S. Xu, Y.Tzeng, R.V. Latham, "Similarities in the 'cold' electron emission characteristics of diamond coated molybdenum electrodes and polished bulk graphite surfaces", *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26 (1993) 1776-1780.
- [11] N.S. Xu, R.V. Latham, Y. Tzeng, "Field dependence of the area-density of 'cold' electron emission sites on broad-area CVD diamond films", *Electron. Lett.*, 29 (1993) 1596-1597.
- [12] S. Mitura, A. Mitura, P. Niedzielski, P. Couvrat, "Nanocrystalline diamond coatings", *Biomaterials*: Vol. 17, Issue 6 (1996) pp 587-595.
- [13] R. Hauert, "A review of modified DLC coatings for biological applications", *Diamond Relat. Mat.*, 12 (2003) 583-589.
- [14] R. H. Fowler, L. Nordheim, " Electron emission in intense electric fields", *Proc. Roy. Soc. Lon. Ser. A Vol. 119, No. 781 (1928)*, 173-181.

PŁYTKI KRWI W KONTAKCIE ZE STOPEM TYTANU Ti6Al4V I Z JEGO ZMODYFIKOWANYMI POWIERZCHNIAMI

WIESŁAWA OKRÓJ*, LESZEK KLIMEK*, PIOTR KOMOROWSKI*, BOGDAN WALKOWIAK**

*CENTRUM DOSKOŃALOŚCI NANODIAM, POLITECHNIKA ŁÓDZKA W ŁODZI

**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ, UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Slowa kluczowe: adhezja płytka krwi, modyfikacja powierzchni, azotek tytanu, węglonazotek tytanu, mikroskop skaningowy.

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 13-16]

Wstęp

W ostatnich latach poszukuje się metod poprawienia właściwości materiałów stosowanych do produkcji implantów. Tytan i jego stopy, ze względu na wyjątkowe właściwości fizyko-chemiczne oraz sprawdzoną biozgodność, znajdują szerokie zastosowanie w produkcji implantów na potrzeby ortopedii i stomatologii, jak również w wytwarzaniu narzędzi chirurgicznych. Obróbki jarzeniowe, które umożliwiają wytwarzanie warstw TiN i TiCN na gotowych implantach o dowolnym kształcie, wydają się być obiecującymi metodami poprawienia właściwości materiałów tytanowych [1, 2]. Modyfikowanie powierzchni powoduje poprawę wytrzymałości, wzrost odporności na korozję, na zużycie przez tarcie oraz zapobiega przechodzeniu składników stopów do otaczającego środowiska biologicznego [3-5].

Cel

Celem pracy było porównanie oddziaływania płytka krwi z powierzchniami stopu tytanu (Ti6Al4V) i modyfikowanych

BLOOD PLATELETS IN CONTACT WITH TITANIUM ALLOY Ti6Al4V AND WITH ITS MODIFIED SURFACES

WIESŁAWA OKRÓJ*, LESZEK KLIMEK*, PIOTR KOMOROWSKI*, BOGDAN WALKOWIAK**

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ.

**DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ.

Key words: platelet adhesion, surface modification, titanium nitride, titanium carbonitride, scanning electron microscopy.

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 13-16]

Introduction

New methods capable of improving properties of materials used for implant production are currently being searched. Due to their unique physico-chemical properties and excellent biocompatibility, titanium and its alloys are widely used in a manufacture of implants in orthopaedics and dentistry as well as in a production of surgical instruments. Surface processing, such as glow discharge nitriding and carbonitriding, of titanium based materials, which creates TiN or TiCN layers on ready implants of whichever shape, appears to be a very promising method improving their properties [1,2]. Surface modification enhances their durability, improves their corrosion resistance, decreases friction wear and prevents diffusion of alloy components into a biological environment [3-5].

The aim

The aim of the study was to compare an interaction of blood platelets with the surface of titanium alloy (Ti6Al4V)

BIOMATERIAŁOW

metodą jarzeniową jego odmian (TiN, TiCN).

Materiały i metody

Próbki

Do badań użyto krążków grubości 3 mm i średnicy 8 mm, wykonanych ze stopu tytanu (Ti6Al4V) i takich samych krążków pokrytych azotkiem tytanu (TiN) i węgloazotkiem tytanu (TiCN), o zawartości węgla 4% lub 16% at. C, w procesie azotowania i węgloazotowania jarzeniowego. Materiał do badań uzyskano dzięki uprzejmości prof. Tadeusza Wierzchońa z Politechniki Warszawskiej.

Kontakt badanych powierzchni z krewią

Przed eksperymentem próbki umyto dwukrotnie w wodzie destylowanej, a następnie w etanolu w myjce ultradźwiękowej i ponownie w wodzie. Krew pobierano od zdrowych ochotników, którzy nie stosowali żadnych leków antyplątkowych w ciągu trzech tygodni przed badaniem. Cała procedura była zgodna z Deklaracją Helsińską. Jako antykoagulantu użyto 3,8% wodny roztwór cytrynianu sodu. W celu uzyskania osocza ubogoplątkowego (PPP) krew odwiewano (1000xg, 10 min, RT). Wszystkie próbki (Ti6Al4V, TiN, TiCN) umieszczone w PPP na kilkanaście godzin przed eksperymentem i inkubowano w temperaturze 4°C. Następnie próbki płukano dwukrotnie w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4, zawierającym 140 mM NaCl (PBS). Tak przygotowane próbki poddano kontaktowi z pełną krewią cytrynianową przez okres jednej godziny, przy zapewnieniu ciągłego ruchu krwi w probówce. Po zakończonej inkubacji próbki były dwukrotnie przemywane buforem PBS, a następnie utrwalane w 2,5% aldehydzie glutarowym, przygotowanym w 0,1 M buforze fosforanowym, pH 7,4, w ciągu godziny w temperaturze 4°C. Po kolejnym dwukrotnym przemyciu buforem fosforanowym próbki poddano odwodnieniu stosując alkohol etylowy w narastającym stężeniu. Po wysuszeniu próbki poddano napełnieniu 20-30 nm warstwą złota (napylarka JEOL JEE-4X). Obserwacji próbek dokonywano w mikroskopie skaningowym HITACHI - 3000 N przy napięciu 5 kV. Dla każdej badanej próbki wykonano 30 zdjęć (powiększenie 1000 i 4000 razy) umożliwiających opisanie morfologii płytka obecnych na badanych powierzchniach oraz wykonanie statystycznej analizy z użyciem testów Fishera i t-Studenta.

Wyniki

Jednogodzinny kontakt stopu tytanu (Ti6Al4V) z pełną krewią powoduje, że na powierzchni próbek pojawiają się liczne płytki krwi oraz pojedyncze leukocyty. Zaadherowane płytki posiadały długie pseudopodia i przylegały do próbki pojedynczo lub tworząc rozległe agregaty rozmieszczone regularnie na całej powierzchni materiału (RYS. 1a). Podobnie przylegające płytki krwi zaobserwowano na powierzchni azotku tytanu (TiN), gdzie płytki krwi pokrywały badane materiały pojedynczo lub tworzyły agregaty składające się z różnej ich liczby (RYS. 1b). Na próbках TiCN (4% at.C) i TiCN (16% at.C) stwierdzono obecność płytka krwi kulistego kształtu z nielicznymi i bardzo krótkimi wypustkami. Układają się one zwykle pojedynczo na całej powierzchni (RYS. 1c i RYS. 1d). Największa liczba płytka krwi przylegała do powierzchni azotku tytanu. Na 1 μm^2 przypadło ich średnio 0,011. Najmniej krwinek płytka obecnych stwierdzono na próbce pokrytej warstwą węgloazotku tytanu z 4% zawartością węgla - średnio 0,0042/ μm^2 (RYS. 2). Statystyczna analiza uzyskanych wyników pozwoliła określić stopień agregacji płytka na poszczególnych powierzchniach.

as well as with its modified forms, obtained with the help of glow discharge nitriding (TiN) and carbonitriding (TiCN).

Materials and methods

Samples

Titanium discs (3 mm thick and 8mm in diameter), made of titanium alloy (Ti6A14V), and identical discs coated with titanium nitride (TiN) and titanium carbonitride (TiCN containing either 4% or 16% at.C) were used. The samples were acquired thanks to the courtesy of Professor Tadeusz Wierzchoń of the Warsaw University of Technology.

Contact of examined surfaces with blood

Before each experiment, samples were washed in a supersonic washer, twice with distilled water then with ethanol and again with water. Blood was collected from healthy volunteers, who had not been using any antiplatelet drugs for three weeks before the experiment. All the procedures were carried out according to Helsinki Declaration. Blood was anticoagulated with 3.8% water solution of sodium citrate. Platelet poor plasma (PPP) was obtained by blood centrifugation (1000xg, 10 min, RT). All the samples (Ti6A14V, TiN, TiCN) were placed in PPP for several hours before the experiment and were incubated at 4°C. Subsequently, the samples were washed twice with 0.1M phosphate buffer pH 7.4, containing 140 mM NaCl (PBS). The specimens prepared in this way were allowed for one hour contact with citrated whole blood. Blood was constantly kept in motion by end to end mixing. The incubation was finished by a double washing of each sample with PBS and subsequent fixing it with 2,5% glutaraldehyde prepared in 0.1M phosphate buffer. The fixing procedure was carried out for one hour at 4°C, and was followed by a double washing with PBS. Subsequently, samples were dehydrated using ethanol of an increasing concentration. After air drying the samples were coated with 20-30 nm layer of gold (JEOL JEE-4X vacuum evaporator), and they were examined using scanning microscope HITACHI-3000 N (voltage of 5 kV). Thirty photographs of every sample were taken (magnification of 1000x and 4000x), enabling description of a morphology of blood platelets present at examined surfaces as well as statistic evaluation of data (Fisher test and t-Student's tests).

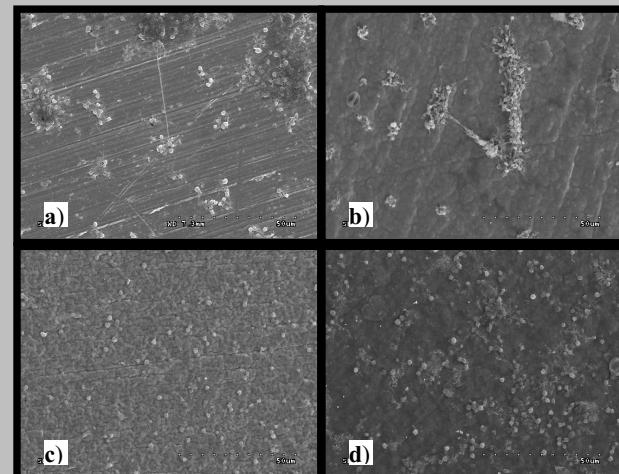


FIG. 1. Badane powierzchnie po 1 godzinnym kontakcie z krewią cytrynianową. a-Ti6Al4V, b-TiN, c-TiCN 4% at.C, d-TiCN 16% at.C .

FIG. 1. Randomly selected surfaces after 1 hour contact with citrated whole blood.

a-Ti6Al4V, b-TiN, c-TiCN 4% at.C, d-TiCN 16% at.C.

powierzchnia surface	Liczba płytak w agregacie Number of platelets in an aggregate																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ti6Al4V	137	60	38	29	22	28	13	9	14	11	9	5	6	7	8	6	1	4	4	0
TiN	14	37	46	67	59	69	81	58	37	46	18	20	10	7	6	9	5	4	4	2
TiCN 16%	3663	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TiCN 4%	1599	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

TABELA 1. Stopień agregacji płytak na badanych powierzchniach.
TABLE 1. Extent of platelet aggregation at observed surfaces.

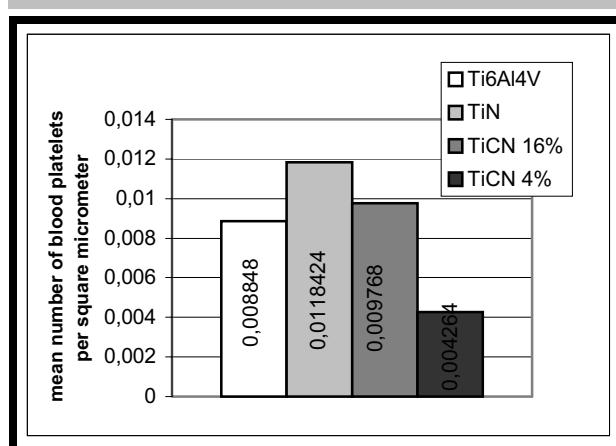


FIG. 2. Średnia liczba płytak krwi przypadająca na 1 μm^2 powierzchni badanych materiałów.
FIG. 2. Mean number of blood platelets adhered to 1 μm^2 of investigated surfaces.

W przypadku powierzchni stopu tytanu i azotku tytanu obserwowano dużą liczbę płytak krwi w powstałych agregatach podczas gdy na powierzchniach węgloazotku tytanu brak było agregatów (TAB. 1).

Dyskusja

Jednym z pierwszych procesów zachodzących podczas kontaktu implantu z krewią jest odkładanie się białek osocza na jego powierzchni. Niektóre białka osocza obecne na powierzchni implantu, np. fibrynogen i vWF, pośredniczą w adhezji płytak krwi. Natomiast inne białka, jak albuminy i gamma-globulin, nie uczestniczą w tym procesie [6, 7]. Aktywacja płytak krwi prowadzi do zmiany ich kształtu, tworzenia pseudopodiów, uwalniania zawartości wewnętrznych płytakowych ziarnistości oraz inicjowania agregacji [8]. Niektórzy autorzy uważają, że białka pokrywające wszczep mogą determinować biozdolność implantu [9]. Materiałom przeznaczonym do kontaktu z krewią stawia się bardzo wysokie wymagania. Między innymi oczekuje się, że ich powierzchnia nie będzie wywoływać krzepnięcia krwi oraz będzie wolna od zaadsorbowanych elementów morfotycznych, szczególnie płytak krwi [6, 10]. Wykonane badania pozwoliły ustalić, że płytak krwi przylegają do wszystkich badanych powierzchni, jednak w różny sposób i z różną intensywnością tego procesu. Na powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V i azotku tytanu (TiN) zaadherowane płytak krwi mają kształt dendrytyczny z licznymi długimi pseudopodiumi i tworzą

Results

One hour contact of titanium alloy (Ti6Al4V) with citrated whole blood resulted in an appearance of numerous platelets and single leukocytes on the sample surfaces. The platelets adhered were equipped with long pseudopodia. They were present either as isolated species or in aggregates scattered regularly through the whole surface (FIG. 1a). Blood platelets with long pseudopodia could also be observed adhered to the titanium nitride surface (TiN). They, again, covered the material either as isolated species or created aggregates consisting of different number of platelets (FIG. 1b). TiCN (4% at.C) and TiCN (16% at.C) sample surfaces exhibited isolated platelets having spherical shape and equipped with a few very short pseudopodia (FIGS. 1c and 1d, respectively). A higher number of adhered platelets was found on the surface of titanium nitride - on average there was 0.011 of a platelet per 1 μm^2 of area. A lower number of blood platelets, 0.0042 of a platelet per μm^2 only (see FIG. 2), adhered to titanium carbonitride layer containing 4% atomic C. Statistical analysis of the results enabled a description of the extent of platelet aggregation on different surfaces. Titanium alloy and titanium nitride surfaces exhibited aggregates containing numerous platelets, whereas titanium carbonitride surfaces were free from the aggregates (TAB. 1).

Discussion

One of the first processes, taking place during the contact of an implant with blood, is a deposition of plasma proteins on the implant surface. Some plasma proteins, such as fibrinogen and vWF, present on the surface of an implant, mediate blood platelets adhesion. Other proteins, like albumins and gamma-globulins, do not take part in this process [6, 7]. Activation of blood platelets comprises a change of their shape, with the pseudopodia being created, a release of platelet granules content and an initiation of the aggregation process [8]. Some authors claim that proteins covering the implant can determine its biocompatibility [9]. Very strict requirements have to be fulfilled by materials remaining in contact with blood. It is expected that a material surface will not initiate coagulation and will be free from adsorbed blood cells, especially from platelets [6, 10]. Our study indicates that platelets do adhere to every surface, but they adhere in a different manner and at different intensity. The platelets adhered to the surfaces of titanium alloy Ti6Al4V and titanium nitride (TiN) have a dendrite-like shape with long pseudopodia and create aggregates of a different

agregaty płytowe o różnej wielkości (2-8 płytowe na Ti6Al4V i 8-12 płytowe na TiN). W przypadku węgloazotków (TiCN) krewinki płytowe są zaktywowane tylko nieznacznie, co manifestuje się zmianą kształtu, brakiem wyraźnych pseudopodiów i brakiem agregatów. Do próbki TiCN (16% at.C) zaadherowało dwukrotnie więcej płyt krwi niż do TiCN (4% at.C). Reasumując, można wskazać węgloazotek tytanu o zawartości węgla 4% jako najbardziej trombozgodny materiał spośród badanych.

Podziękowania

Praca częściowo finansowana przez KBN w ramach grantów: 7 P08D 03621 oraz 13/PBZ - KBN - 082/T08/2002

Piśmiennictwo

- [1] Wierzchoń T., Czarnowska E., Marana-Niedbała A., Zegadło-Mylik M.: Obróbki jarzeniowe tytanu i jego stopów w aspekcie zastosowań w medycynie. Inżynieria Materiałowa 2/1999 57-61.
- [2] Major B., Wierzchoń T., Ebner R., Klimpel A., Maranda-Niedbała A., Branstatter E., Kruzel G., Grucha R.: Structure and properties of titanium based layers produced using advanced methods. Inżynieria Materiałowa 5/2001, 611-615.
- [3] Maranda-Niedbała A., Wierzchoń T., Czarnowska E.: Struktura i właściwości warstw powierzchniowych wytworzonych na stopie tytanu Ti-1Al-1Mn w warunkach wyładowania jarzeniowego. Inżynieria Materiałowa 5 (2001), 611.
- [4] Czarnowska E., Wierzchoń T., Marana - Niedbała A.: Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility in vitro tests. Journal of Materials Processing Technology 92-93 (1999), 190-194.
- [5] Takadomi J., Houmid Benneni H., Allouard M.: Friction and wear characteristics of TiN, TiCN and diamond-like carbon films. Surf Coat Technol 88 (1996), 232-238.

size (2-8 platelets on Ti6A14V and 8-12 platelets on TiN). For a contrast, the platelets adhered to carbonitride (TiCN) surfaces are only slightly activated - with a shape change, lack of pseudopodia and lack of aggregation. It is worth to note, that twice as many platelets adhered to the TiCN (16% at.C) surface than to the TiCN (4% at.C) surface. In a conclusion it can be stated that, among the examined materials, titanium carbonitride with 4% of carbon exhibit the lowest activating properties.

Acknowledgements

This work was partially supported by KBN grants no. 7 P08D 03621 and 13/PBZ - KBN - 082/T08/2002

References

- [6] Jones M.I., McColl I.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Hemocompatibility of DLC and TiC-TiN interlayers on titanium. Diam. Relat Mat 8,1999, 457-462.
- [7] Jones M.J., McCall J.R., Grant D.M., Parker K.G., Parker T.L.: Protein adsorption and platelet attachment and activation on TiN, TiC and DLC coating on titanium for cardiovascular applications. J Biomed Mater Res 52, 2000, 413-431.
- [8] Park J.Y., Davies J.E.: Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. Clin Oral Implant Res 2000, 11, 530-539.
- [9] Zeng H., Chittur K.K., Lacefield W.R.: Analysis of bovine serum albumin on calcium phosphate and titanium surfaces. Biomaterials 1999, 20, 377-384.
- [10] Courtney J.M., Lamba L.M., Sundaram S., Forbes C.D.: Biomaterials for blood contacting applications. Biomaterials 15, 1994, 737-744.

PRZYGOTOWANIE BIOSSENSORA SPR, PRACUJĄCEGO W REALNYM CZASIE, DO BADANIA ODKŁADANIA SIĘ BIAŁEK NA POWIERZCHNI TYTANU I NA WARSTWACH NCD

MARTA KAMIŃSKA*, JACEK SZYMAŃSKI**, BOGDAN WALKOWIAK*

*CENTRUM DOSKOŃALOŚCI NANODIAM, POLITECHNIKA ŁÓDZKA

**CENTRUM DOSKOŃALOŚCI MOLMED, UNIWERSYTET MEDYCZNY
W ŁODZI

Streszczenie

Adsorpcja i odkładanie się białek osoczowych na sztucznych powierzchniach implantów medycznych, wspomaga proces adhezji komórek. Zjawisko to stanowi poważny problem w implantologii. Użycie biosensorów SPR, pracujących w systemie BiaCore,

PREPARATION OF REAL TIME SPR-BIOSENSORS FOR STUDY OF PROTEIN DEPOSITION AT TITANIUM AND NCD SURFACES

MARTA KAMIŃSKA*, JACEK SZYMAŃSKI**, BOGDAN WALKOWIAK*

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, TECHNICAL UNIVERSITY
OF LODZ, POLAND,

**CENTRE OF EXCELLENCE MOLMED, MEDICAL UNIVERSITY OF
LODZ

Abstract

Adsorption and deposition of plasma proteins at artificial surfaces of medical implants promote cell adhesion process. SPR-biosensors, working in the BiaCore system, enable studies in a real time of the phenomenon of protein deposition onto surfaces of titanium and NCD (nanocrystalline diamond). It was shown, that sensors covered with very thin layers (less than 30 nm) of both, titanium and NCD, exhibit simi-

umożliwia badania odkładania się białek na powierzchniach tytanu i na warstwach NCD (nanocrystalline diamond), w realnym czasie trwania procesu. Pokazano, że sensory pokryte bardzo cienkimi warstwami (poniżej 30 nm), zarówno tytanu jak i NCD, charakteryzują się czułością porównywalną do czułości sensora kontrolnego.

Słowa kluczowe: BiaCore, plazmonowy rezonans powierzchniowy, warstwy węglowe, adsorcja białek.
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 16-20]

Wstęp

Oddziaływanie powierzchni biomateriałów z płynami ustrojowymi ma zasadnicze znaczenie w określaniu ich biozgodności. Wiadomo, że adsorcja i odkładanie się białek oso- cza krwi na sztucznych powierzchniach implantów, ma decydujące znaczenie w procesie adhezji komórek - zarówno elementów morfotycznych krwi, osteoblastów, komórek endotelialnych i innych komórek organizmu biorcy, jak i bakterii. W konsekwencji zjawisko to może być pozytywną cechą biomateriału (osteointegracja), lub prowadzić do utraty funkcjonalności implantu i/ lub reakcji zapalnych, niebezpiecznych dla organizmu. Dlatego wydaje się bardzo istotną sprawą monitorowanie interakcji powierzchni biomateriału z białkami zawartymi w płynach fizjologicznych, szczególnie w warunkach ich przepływu. System BiaCore daje możliwość prowadzenia takich badań. Pozwala on na śledzenie oddziaływań molekuł w realnym czasie trwania procesu [1, 2].

Zjawisko SPR

Centrum systemu BiaCore stanowi sensor SPR, wykorzystujący optyczne zjawisko zwane powierzchniowym re-

lar sensitivity as a control gold-surface sensor.

Key words: BiaCore, surface plasmon resonance, carbon coatings, proteins adsorption.

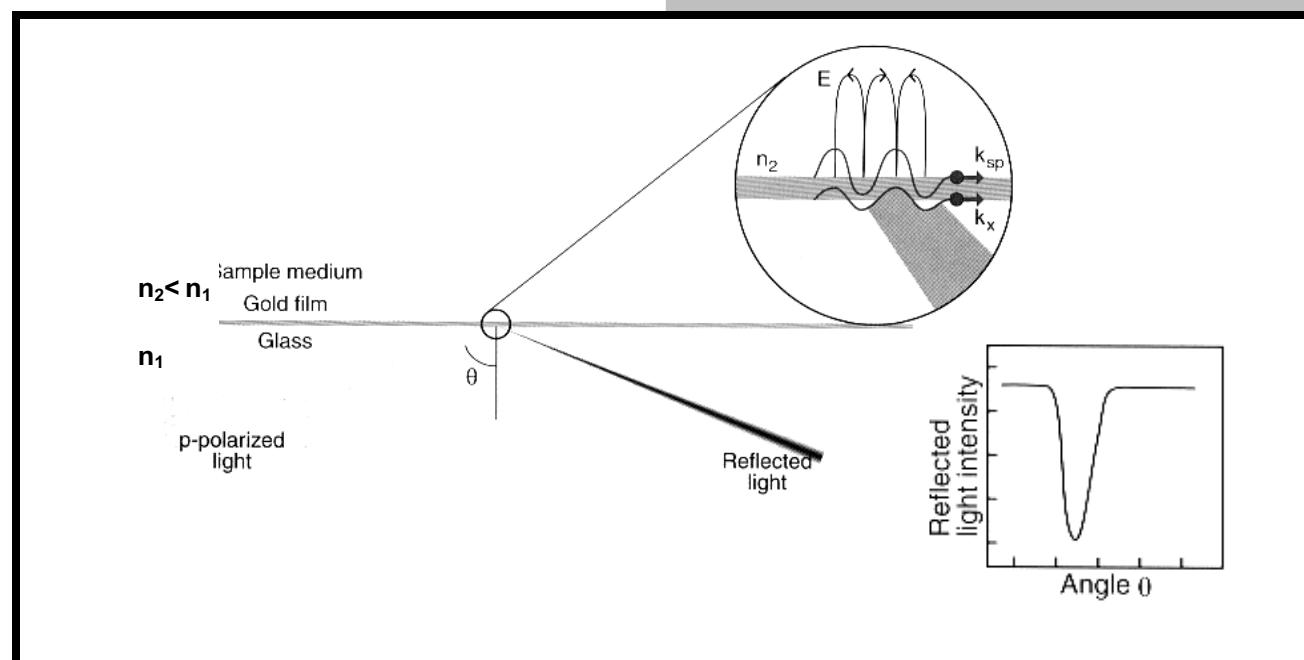
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 16-20]

Introduction

An interaction of body fluids with biomaterials surfaces is crucial for determination of biocompatibility. It is well known, that adsorption and deposition of plasma proteins on the artificial surfaces of implants promote process of cell adhesion. It concerns of blood cells, osteoblasts, endothelial cells and other type of recipient's cells, as well as bacteria. Consequently, it may be a positive feature of biomaterial (osteointegration), or it can result in functional loss of an implant and/or inflammatory reactions which are dangerous for the organism. Thus, it is very important to monitor interactions of biomaterials with plasma proteins, especially under flow conditions. The BiaCore system enables such the studies. The system allows to monitor interactions of molecules in the real time of the process [1, 2].

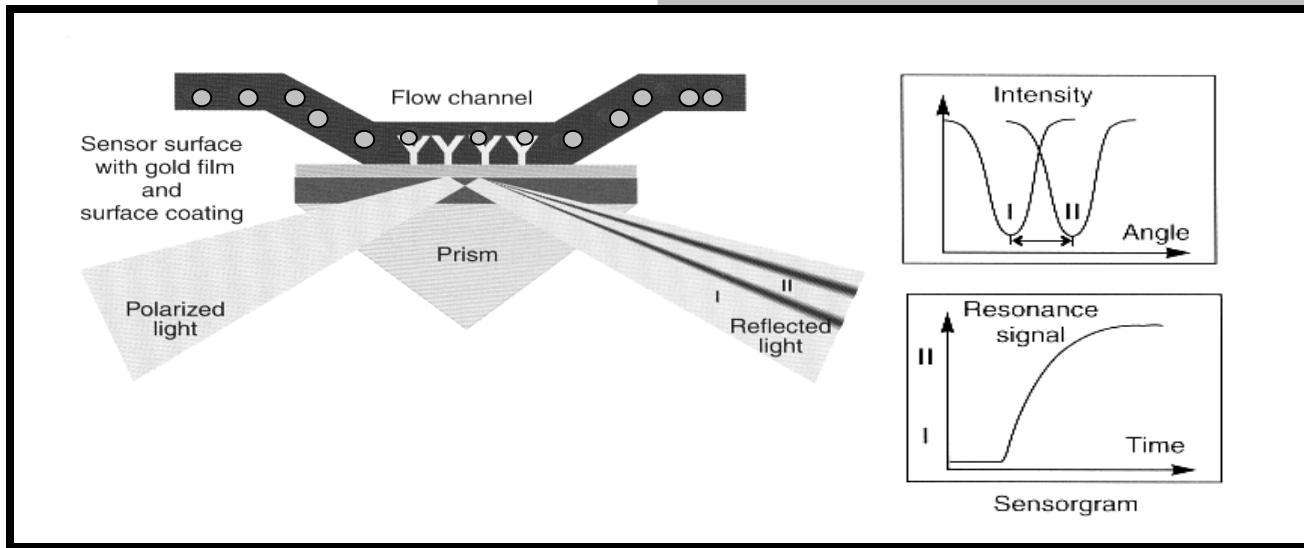
SPR phenomenon

The core of BiaCore system is a SPR-sensor, which employs optical phenomenon referred to as the surface plasmon resonance (SPR). In order to describe SPR, it is helpful to start with the phenomenon of total internal reflection (TIR), which occurs when a light beam, propagates in a medium of higher refractive index, meets an interface at a medium of lower refractive index at an angle of incidence above a critical angle. These media are separated by very thin metallic layer. In these conditions, oscillations of free electrons of metallic layer - plasmon, are excited. Excitation



RYS. 1. Zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia na granicy dwóch ośrodków i wzbudzenie powierzchniowego rezonansu plazmonowego. k_{sp} i k_x są odpowiednio wektorami falowymi plazmonu i padającego światła, natomiast n_1 i n_2 są współczynnikami załamania światła. Ilustracja pochodzi z materiałów promocyjnych firmy BiaCore AB [4].

FIG. 1. The phenomenon of total internal reflection on the boundary of two media and the excitation of surface plasmon resonance. k_{sp} and k_x correspond to a wave vector of plasmon and incidenting light, respectively. n_1 i n_2 are the coefficients of light refraction, respectively. The scheme comes from promotional materials of BiaCore AB company [4].



RYS. 2. Schemat budowy i działania systemu BiaCore. Ilustracja pochodzi z materiałów promocyjnych firmy BiaCore AB [4].

FIG. 2. The scheme presents principle of operation of the BiaCore system. The scheme comes from promotional materials of BiaCore AB [4].

zonansem plazmonowym (SPR - surface plasmon resonance). Zjawisko to zachodzi gdy fala świetlna pada na granicę dwóch środowisk, różniących się gęstościami optycznymi, rozdzielonych cienką warstwą metalu, pod kątem większym od kąta granicznego. Następuje wówczas całkowite wewnętrzne odbicie (TIR - total internal reflection) fali świetlnej. Jednocześnie w takich warunkach wzbudzane są oscylacje swobodnych elektronów warstwy metalicznej - plazmonu. Wzbudzenie oscylacji, czyli pochłonięcie przez plazmon ściśle określonej porcji energii, ujawnia się jako deficyt energii, odczytywany pod określonym kątem odbicia, zależnym od warunków rezonansu. (RYS. 1).

Czujnik SPR najczęściej stanowi szklana płytka pokryta cienką warstwą złota (40 - 50 nm). Ta metaliczna warstwa kontaktuje się z kanałem przepływowym, w którym znajduje się badany płyn fizjologiczny. Obecność makrocząsteczek przy powierzchni sensora zmienia właściwości dielektryczne środowiska optycznie rzadszego. Rezonans plazmonowy jest bardzo czuły na zmiany stałej dielektrycznej. Każda zmiana wartości ϵ tego środowiska wiąże się ze zmianą warunków rezonansu plazmonowego, a więc ze zmianą kąta światła odbitego, dla którego występuje deficyt energii. Istnieje możliwość wyznaczenia masy makromolekułów, znajdujących się przy powierzchni sensora, korzystając z zależności pomiędzy współczynnikiem załamania światła (wartością stałej dielektrycznej) roztworu i stężeniem makromolekułów [5]. Zasadę odczytu zmiany masy przy powierzchni sensora demonstruje RYSUNEK 2.

Cel pracy

Celem badań było znalezienie warunków odpowiednich do przygotowania biosensorów SPR, pokrytych warstwą tytanu lub NCD, pozwalających na obserwację interakcji tych materiałów z przepływającymi makromolekułami.

Materiał i metody

Do badań zastosowano komercyjnie dostępne sensory (SIA-kit) zakupione w firmie BiaCore AB (Uppsala, Szwecja), przeznaczone do samodzielnego pokrywania po-

of oscillations, it means adsorption of very precise portion of energy by plasmon, is revealed as a deficiency of energy, read-out by definite reflection angle.

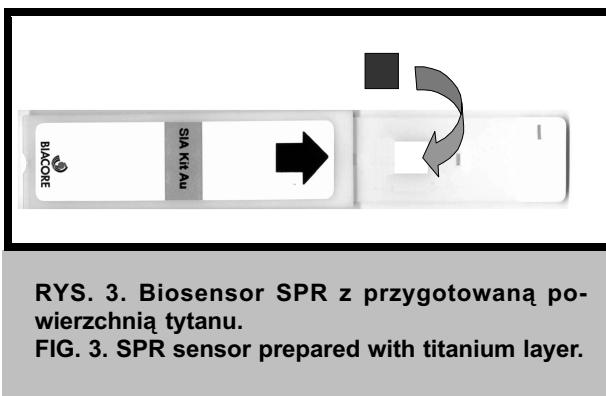
SPR sensor consist of glass plate with a thin gold layer (40-50 nm). This metallic layer is in contact with flow channel, which is filled with tested fluid. The presence of makromolecules at the surface, changes the dielectric properties of lower refractive index medium. The plasmon resonance is very sensitive to changes of dielectric constant (ϵ). The change of ϵ induces modification of plasmon resonance conditions. It results in energy deficiency in the respective angle of reflected light. It is possible to determine the mass of macromolecules, present at the sensor's surface, using the dependence between light reflection coefficient (the value of dielectric constant) of solution and concentration of macromolecules [5]. The principle of read-out of mass change on the sensor surface demonstrates FIGURE 2.

The aim

The aim of this study was to find optimal conditions for preparing SPR sensors, coated with titanium or NCD layers, which allow us for observation of materials in contact with flowing macromolecules.

Materials and methods

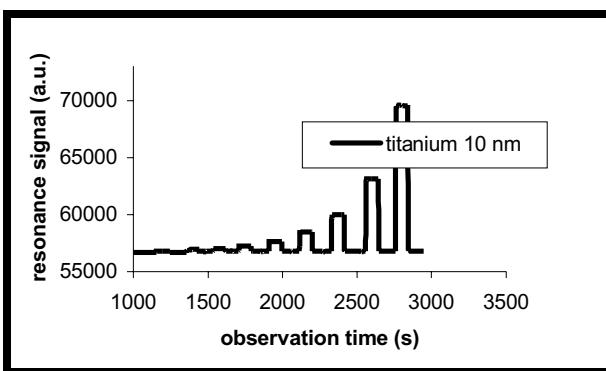
In this study commercially available sensors (SIA-kit, BiaCore AB, Uppsala, Sweden) predicted for coating with the tested materials were used (FIG. 3). The sensor surface was coated with titanium layer, with thickness of 10, 20 or 30 nm (manufactured by prof. Bogdan Wendler), or with NCD layer, with thickness of around 10 nm. Titanium was deposited using magnetron sputtering whereas NCD was synthesised using RFPCVD method (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) [3]. A sensitivity of prepared sensors was tested for various concentrations of glucose (0-70%). PBS was used as a basic buffer (10 mM phosphate buffer containing 140 mM NaCl). Platelet poor plasma was used for study of proteins interactions with sensor surface.



RYS. 3. Biosensor SPR z przygotowaną powierzchnią tytanu.

FIG. 3. SPR sensor prepared with titanium layer.

wierzchni czynnej sensora warstwą badanego materiału (RYS. 3). Na powierzchnię sensorów naniesiono warstwę tytanu o grubości 10, 20 lub 30 nm (wykonane przez prof. Bogdana Wendlera), lub warstwę NCD o grubości około 10 nm. Tytan nanoszono przy użyciu magnetronu, natomiast NCD wytworzono metodą RFPCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) [3]. Czułość tak przygotowanych sensorów testowano dla różnych stężeń glukozy (0-70%). Jako bufor podstawowy stosowano PBS (10 mM bufor fosforanowy zawierający 140 mM NaCl). Do badania oddziaływania białek z powierzchnią sensora użyto ubogopłytkowego osocza krwi ludzkiej.



RYS. 5. Sensogram dla powierzchni sensora z warstwą tytanu (10 nm) oddziaływanego z roztworem glukozy o narastającym stężeniu.

FIG. 5. The sensogram obtained for sensor surface coated with titanium (10 nm) during contact with increasing glucose concentration.

Rezultaty i dyskusja

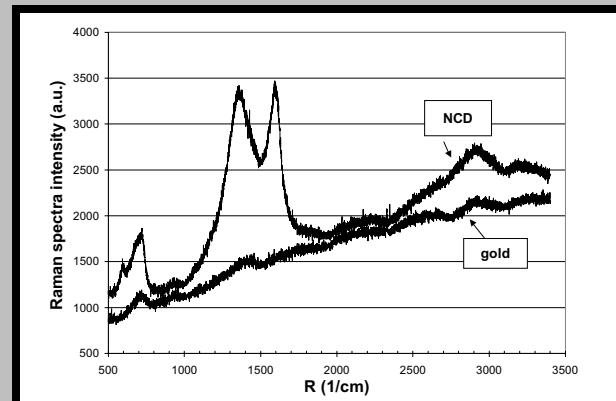
Obecność warstwy NCD na powierzchni sensora potwierdzono przy pomocy analizy ramanowskiej (RYS. 4). Analiza ta wskazuje na obecność fazy diamentowej (1330 - 1350 nm) i grafitowej (1580 nm).

Czułość detekcji poszczególnych sensorów określano stosując glukozę w narastającym stężeniu. RYS.5 przedstawia przykładowy sensogram, uzyskany dla warstwy tytanu o grubości 10 nm. Zwiększąca się wysokość sygnału odpowiada wzrostowi masy (wzrastające stężenie glukozy) przy powierzchni sensora, wynikającej z przepływu płynu o różnej gęstości.

Badania pokazały, że czułość przygotowanych sensorów z warstwą NCD lub tytanu (o grubości warstwy 10 nm) jest porównywalna z czułością sensora kontrolnego (warstwa złota) (RYS. 6). Warstwa tytanu o grubości 20 nm powoduje znaczny spadek czułości sensora, natomiast grubość warstwy tytanu sięgająca 30 nm powodowała utratę

Results and discussion

The presence of NCD layer on the sensor surface was confirmed by Raman spectrometry (FIG.4). This analysis



RYS. 4. Widmo Ramana powierzchni sensora przed i po naniesieniu warstwy NCD.

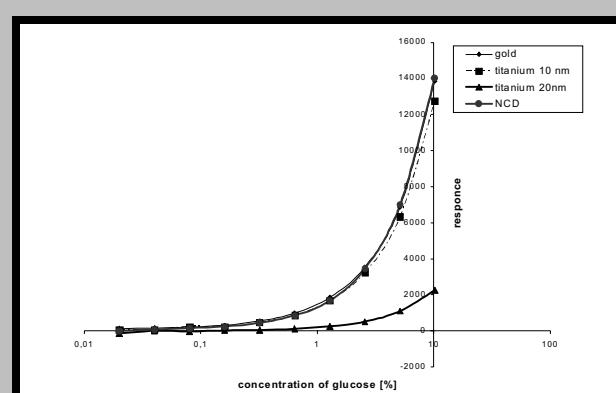
FIG. 4. Raman spectra of sensor surface with and without NCD layer.

confirms the presence of diamond (1330 - 1350 nm) and graphite (1580 nm).

The sensitivity of individual sensor was determined using glucose in increasing concentration. The sensogram obtained for titanium surface, with thickness of 10 nm, is shown at the FIG. 5. The increase in signal value corresponds to the increase of mass (increasing content of glucose) at sensor surface, which results from flow of solution with different concentration.

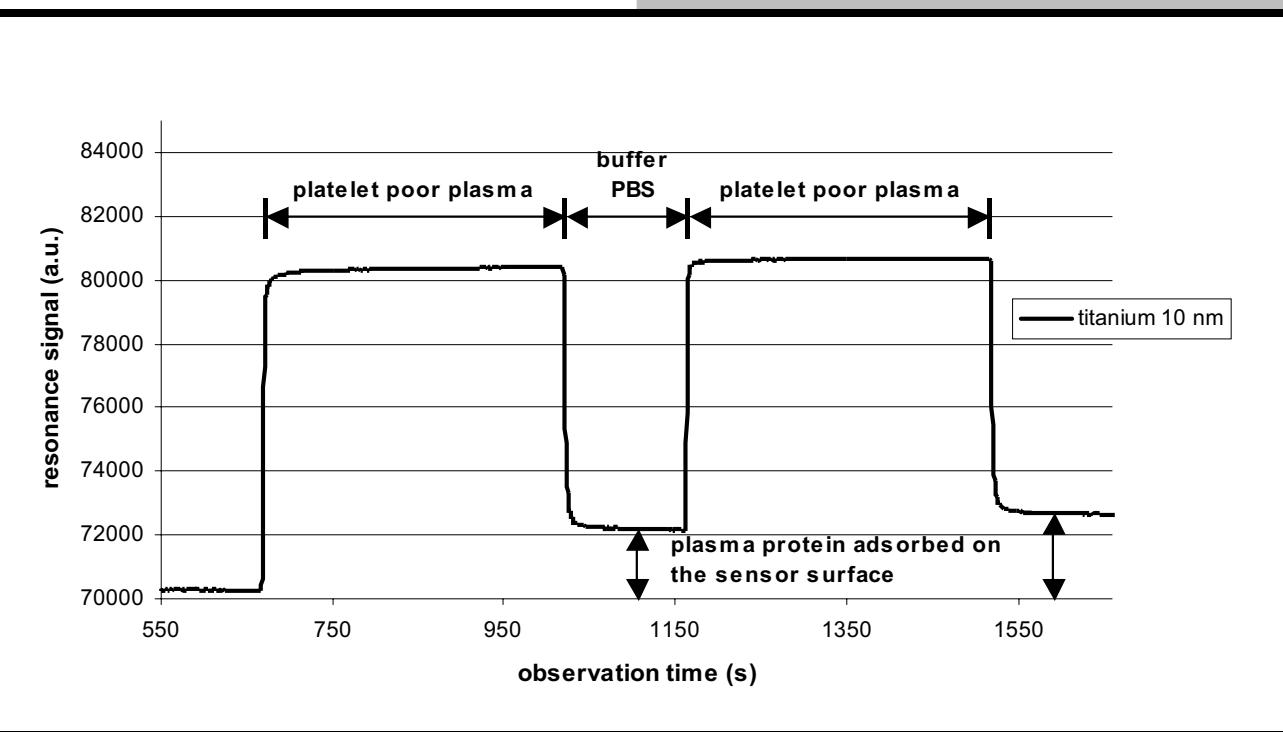
This study shows, that sensitivity of prepared sensors with NCD layer or titanium layer (thickness of 10 nm) is comparable to sensitivity of control sensor (gold alone) (FIG. 6). The sensitivity decreases when the thickness of the layer reaches 20 nm, and is completely lost for layer thickness of 30 nm (FIG. 6).

The preliminary studies performed with titanium coated sensor, tested in contact with blood plasma, showed possibility to read-out a difference of resonance signal value corresponding to the mass of deposited proteins during the flow (FIG. 7).



RYS. 6. Zależność sygnału rezonansu od stężenia glukozy.

FIG. 6. The dependence between signal resonance and glucose concentration.



RYS. 7. Zmiany masy na powierzchni sensora pokrytego warstwą tytanu na skutek interakcji z PPP
FIG. 7. The difference of resonance signal value resulting from the sensor surface interaction with PPP.

właściwości sensora.

Przeprowadzone wstępne badania oddziaływanie powierzchni czynnej sensora tytanowego z osoczem krwi (RYS.7) pokazały, że możliwy jest odczyt różnicy wysokości sygnału rezonansu, odpowiadający masie białek odłożonych na powierzchni sensora w trakcie ich przepływu.

Podziękowania

Praca częściowo finansowana przez KBN w ramach grantów nr: 7 P08D 03621 i 13/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

- [1] Walkowiak B, Kochmańska V, Jakubowski W, Okrój W, Królikczak V, Interaction of body fluids with carbon surfaces, Journal of Wide Bandgap Materials, 4 (9), 231-242, 2002.
- [2] Green J.R, Frazier A.R, Shakesheff M.K, Davies C.M, Roberts J.C, Saul J.B.T, Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials, Biomaterials 21,1823-1835, 2000.

Acknowledgements

This work was partially supported by KBN grants no 7 P08D 03621 i 13/PBZ-KBN-082/T08/2002.

References

- [3] Mitura S, Mitura A, Niedzielski P, Couvrat P, Nanocrystalline Diamond Coatings, Chaos, Solitons & Fractals, 10 (12), 2165-2176, 1999.
- [4] www.biacore.com
- [5] Walkowiak B, Techniki chromatografii cieczowej, wyd. MOPOL, Lublin, 2000.

WZROST KOMÓREK ŚRÓDBŁONKA NA POWIERZCHNI WYBRANYCH BIOMATERIAŁÓW

HANNA JERCZYŃSKA*, PATRYCJA BARAŃSKA*,
WIKTOR KOZIOLKIEWICZ*, BOGDAN WALKOWIAK**,
ZOFIA PAWLÓWSKA*

*CENTRUM DOSKOŃALOŚCI MOLMED,
UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI,
** CENTRUM DOSKOŃALOŚCI NANODIAM,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA

Streszczenie

Przeprowadzone przez nas badania wstępne dotyczyły sprawdzenia zdolności do wzrostu komórek śródłonka ludzkiego na powierzchni wybranych biomateriałów, takich jak stal medyczna, stopy tytanu oraz materiałów modyfikowanych takich jak TiN i NCD (diamond nanokrystaliczny). Komórki śródłonka hodowano na powierzchni próbek, w kształcie dysków. Próbki wykonane były ze stali medycznej (AISI 316 L) w stanie dostawy, stali medycznej polerowanej, stali medycznej polerowanej i pokrytej warstwą NCD, stopu tytanu Ti6Al4V, tego samego stopu pokrytego warstwą NCD oraz stopu tytanu z warstwą TiN. Na podstawie hodowli komórek śródłonka w ciągu 19 godzin wykazaliśmy, że były one zdolne do wzrostu na każdej z badanych powierzchni biomateriałów, jednak wykazywały różną zdolność do adhezji i przeżycia na każdej z tych powierzchni. Zgodnie z malejącą liczbą komórek znalezionych na badanych powierzchniach, można je uporządkować w następujący sposób: surowa stal medyczna, polerowana stal medyczna, polerowana stal medyczna pokryta warstwą NCD, stop tytanu pokryty warstwą NCD, stop tytanu, i stop tytanu pokryty warstwą TiN. Analiza lizatów komórkowych, z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej, wykazała znaczące różnice w profilach białkowych komórek hodowanych w obecności różnych biomateriałów.

Słowa kluczowe: biomateriały, NCD, TiN, komórki śródłonka

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 21-24]

Wstęp

Szereg właściwości powierzchni biomateriałów odgrywa znaczącą rolę w powodzeniu zabiegów chirurgicznych z użyciem implantów. Długotrwały kontakt komórek śródłonka z biomateriałem może mieć kluczowe znaczenie dla przebiegu wielu procesów biologicznych. Odpowiedź komórek endotelialnych na taki kontakt może być bardzo istotnym czynnikiem w powstawaniu stanów zapalnych, krzepnięciu krwi, angiogenezie i w wielu innych procesach, w których komórki śródłonka biorą udział. W przypadku rekonstrukcji naczyń lub chirurgii serca, komórki śródłonka pozostają w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią implantu. Badania oddziaływań komórek śródłonka z powierzchnią biomateriału są także bardzo ważne w dziedzinie produkcji biomateriałów. Dotychczas niewiele wiadomo na temat właściwości adhezyjnych komórek śródłonka eksponowanych na kontakt z biomateriałami. Celem tych badań było spraw-

GROWTH OF ENDOTHELIAL CELLS ON SURFACES OF ELECTED BIOMATERIALS

HANNA JERCZYŃSKA*, PATRYCJA BARAŃSKA*,
WIKTOR KOZIOLKIEWICZ*, BOGDAN WALKOWIAK**,
ZOFIA PAWLÓWSKA*

*CENTRE OF EXCELLENCE MOLMED,
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ,
**CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Abstract

Our preliminary study concerned the ability of human endothelial cells to grow on the surface of selected biomaterials, such as medical steel and titanium alloys, both unmodified and surface modified with TiN and NCD (nanocrystalline diamond). Cells were cultured on the surface of discoidal shape samples of the following materials: crude medical steel (AISI 316 L), polished medical steel, NCD coated polished medical steel, titanium alloy Ti6Al4V, NCD coated titanium alloy, and titanium alloy coated with TiN. Following 19 hours of culture growth of endothelial cells on the above biomaterials, no surface entirely free from the cells was found. It was found, however, that the cells revealed different ability to adhere and grow on each of these surfaces. The sequence of materials exhibiting an order of detected cells, decreasing from the highest number to the lowest one, was as follows: crude medical steel, polished medical steel, NCD coated polished medical steel, NCD coated titanium alloy, titanium alloy and titanium alloy with TiN surface. A 2D electrophoresis of protein lysates of endothelial cells, grown on different biomaterial surfaces, revealed significant differences in protein profile of the cells cultured in the presence of different biomaterials.

Key words: biomaterials, NCD, TiN, endothelial cells

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 21-24]

Introduction

There are several features of biomaterial surfaces that play a fundamental role in a successful use of a surgery implant. A long-term contact of endothelial cells with a biomaterial can be crucial for many biological processes. A response of endothelial cells to this contact may be a high importance factor in the course of such processes as inflammation, blood coagulation, angiogenesis and many others, in which endothelial cells play a key role. In the case of reconstructive arterial or cardiac surgery the cells are in direct contact with an implant surface. Controlling the interaction of cells with biomaterial surfaces is also fundamental to biomaterial industry. Little is known about the adhesive properties of endothelial cells exposed to the contact with biomaterials. The aim of the study was to assess and compare the ability of endothelial cells to grow on the surface of medical steel (AISI 316L), titanium alloys (Ti6Al4V) as well as on the surface of the same materials modified with thin

dzenie i porównanie zdolności komórek śródblonka do wzrostu na powierzchni stali medycznej (AISI 316L), stopu tytanu (Ti6Al4V) i powierzchniach materiałów modyfikowanych tj. azotku tytanu (TiN) i nanokrystalicznego diamentu (NCD), oraz zbadanie potencjalnych różnic w profilu białkowym komórek hodowanych w kontakcie z wybranymi biomateriałami.

Materiały i metody

Przygotowanie próbek biomateriałów

Próbki stali medycznej AISI 316L oraz stopu tytanu Ti6Al4V przygotowane zostały standardowymi metodami obróbki mechanicznej. Pokrycia NCD na badanych próbkach wykonane zostały w Zakładzie Inżynierii Biomedycznej, Politechniki Łódzkiej, kierowanym przez Prof. Stanisława Miturę. Modyfikację powierzchni stopu tytanu do azotku tytanu (TiN) wykonano w laboratorium Wydziału Inżynierii Materiałowej, Politechniki Warszawskiej, kierowanym przez Prof. Tadeusza Wierzchońa.

Hodowla komórkowa - warunki standardowe

Materiałem badawczym była linia komórek śródblonka ludzkiego EA.hy 926, otrzymana w wyniku fuzji komórek śródblonka ludzkiego, pochodzących z żyły pępowinowej, z linią komórkową nowotworu płuc A549 [1]. Komórki EA.hy 926 były hodowane z użyciem pożywki DMEM z dodatkiem 10% surowicy wołowej, antybiotyku oraz HAT (100 µM hypoxantyny, 0,4 µM aminopteryny, i 16 µM tymidyny). Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, przy wilgotności nasycenia, w atmosferze 5% CO₂.

Hodowla komórek na powierzchni biomateriałów

Przymyte alkoholem (70%) i wysuszone próbki badanych materiałów, krążki: 8 mm średnicy i 2 mm grubości, były umieszczane w oddzielnych studzienkach 48-dołkowych płytka do hodowli komórkowej w 500 µl pożywki DMEM (10% FBS, 1/250 PS, 1/100 HAT). Do studzienek dodawano następnie 200 µl zawiesiny komórek EA.hy 926. Komórki hodowane następnie przez 19 godzin w standardowych warunkach. Po inkubacji próbki usuwano delikatnie ze studzienek i na ich powierzchnię nanoszono 5 µl znacznika fluorescencyjnego bis-benzamidyny. Po 15 minutach inkubacji w ciemności, próbki oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym (Olympus GX71), a obrazy komórek dokumentowano z użyciem aparatu cyfrowego.

Elektroforeza dwukierunkowa (2D)

Komórki EA.hy 926 hodowano 24 godziny w obecności stali medycznej lub NCD, w standardowych warunkach. Następnie komórki trypsynizowano, przemywano buforem PBS, pH 7,4 i rozpuszczano w buforze lizującym (8M mocznik, 4% CHAPS, 2% bufor IPG 3-10, 1% DTT). Próbki oczyszczano używając zestawu 2-D Clean-Up Kit (Amersham Biosciences) i białka (75 µg) rozdzielano w żelu metodą elektroforezy dwukierunkowej [2, 3] z użyciem aparatu Multiphor II (Amersham Biosciences). Pierwszy kierunek wykonano na paskach IEF pH 3-10, a drugi kierunek w żelu SDS-PAGE 12,5%. Białka w żelu barwiono srebrem, a uzyskane rozdziały dokumentowano z użyciem skanera optycznego.

Wyniki i dyskusja

Ocenę zdolności adhezyjnych komórek śródblonka ludzkiego do wybranych biomateriałów przeprowadzono poprzez hodowlę komórek na powierzchni krążków wykonanych ze

filmów of titanium nitride (TiN) and nanocrystalline diamond (NCD), and to check for any differences in a protein profile of the cells grown in a contact with selected biomaterials.

Materials and methods

Preparation of samples of biomaterials

Samples of medical steel AISI 316L and titanium alloy Ti6Al4V were prepared by standard mechanical processing. NCD coatings were deposited at the Department of Biomedical Engineering, Technical University of Lodz, Poland, headed by Prof. Stanisław Mitura. Titanium alloy surface modification to titanium nitride was performed in the laboratory of Faculty of Materials Sciences, Warsaw University of Technology, headed by Prof. Tadeusz Wierzchoń.

Cell culture - standard conditions

The human endothelial cell line EA.hy 926 is derived from the fusion of human umbilical vein endothelial cells with continuous human lung carcinoma cell line A549 [1]. EA.hy 926 cells were routinely cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with high glucose, containing 10% FBS, supplemented with HAT (100 µM hypoxanthine, 0.4 µM aminopterin, and 16 µM thymidine), and antibiotics. Culture flasks were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% of air.

Cell culture on biomaterials

Samples of the studied materials, having a form of 8 mm in diameter and 2 mm thick discs were washed with 70% ethanol, dried and placed face up in separate wells of 48 well tissue culture plate, and were immersed in 500 µl DMEM medium (10%FBS, 1/250 PS, 1/100 HAT). The samples were supplemented with 200 µl of EA.hy 926 cells suspension. The cells were cultured for 19 hours in standard conditions. After that, the samples were gently removed from wells, and 5 µl of bis-benzamidine, a fluorescent dye, was applied onto each sample surface. After 15 minutes of incubation, in the dark, the samples were inspected with fluorescence microscope (Olympus GX71). The observed cells were documented with a CCD camera.

2D gel electrophoresis

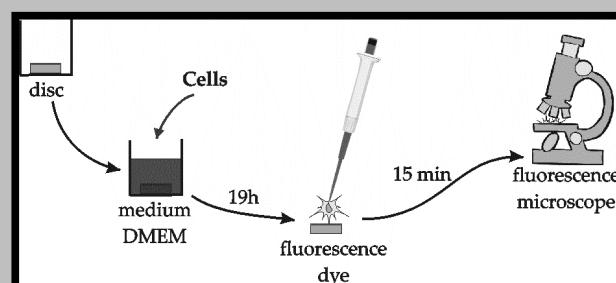
EA.hy 926 cells were cultured for 24h in the presence of medical steel or NCD in a standard conditions. Subsequently, the cells were trypsinized, washed with PBS, pH 7.4 and suspended in a lysis buffer (8M Urea, 4% CHAPS, 2% buffer IPG 3-10, 1% DTT). Samples were purified with Plus One 2-D Clean-up Kit (Amersham Biosciences) and 75 µg of proteins were separated in 2-D electrophoresis [2, 3] with use of Multiphor II system (Amersham Biosciences). The first direction of electrophoresis was performed with IEF strips, pH 3-10, and the second with 12.5 % SDS polyacrylamide gels. The proteins were detected by silver staining and gels were documented with an optical scanner.

Results and discussion

Adhesive properties of human endothelial cells were evaluated on the basis of their ability to grow, in standard condition, on selected biomaterials, such as medical steel and titanium alloys, both unmodified and surface modified with TiN and NCD. The ability of the cells to adhere and to grow was estimated after 19 hours of incubation, as a number of alive cells found attached to the investigated surfaces. A scheme of the experiment is presented in FIG. 1. Images of living cells, grown in contact with different

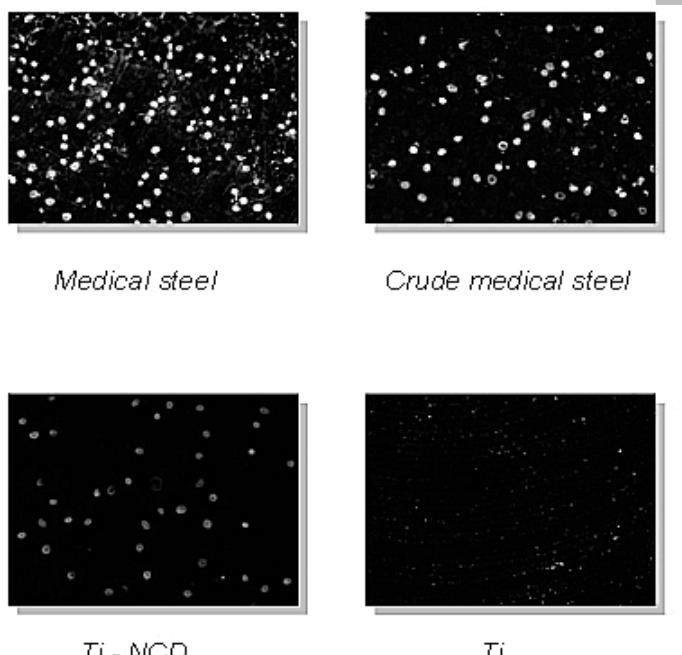
stali medycznej, stopu tytanu i modyfikowanej powierzchni tych materiałów, to jest TiN i NCD. Zdolność do adhezji i wzrostu oceniono na podstawie liczby komórek, które po 19 godzinnej inkubacji były żywe i pozostawały przyklejone do badanego podłożu. Schemat eksperymentu przedstawiony jest na RYS.1.

Obrazy żywych komórek, hodowanych w kontakcie z badanymi materiałami, uzyskane z pomocą mikroskopu fluoroskopu przedstawione są na RYS. 2. Komórki kontrolne hodowane były na standardowych płytach hodowlanych bez zastosowania jakiegokolwiek biomateriału. Komórki śródbłonka adherowały w pewnym stopniu do wszystkich badanych materiałów, jednak długotrwala ich kontakt ze sztucznymi powierzchniami, zmieniał ich zdolność do przeżycia na zastosowanym podłożu. Biomateriały można następująco uporządkować według malejącej liczby komórek zdolnych do rozwoju na ich powierzchni: zwykła stal medyczna, stal medyczna polerowana, polerowana

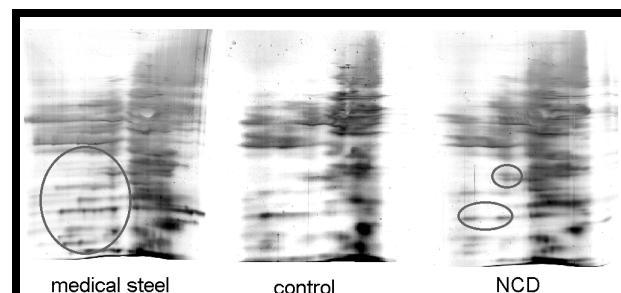


RYS.1. Schemat eksperymentu mającego na celu określenie zdolności komórek śródbłonka do wzrostu na powierzchni biomateriału.

FIG.1. A scheme of the experiment testing the ability of endothelial cells to grow on a surface of a biomaterial.



RYS. 2. Wpływ wybranych biomateriałów na zdolność komórek śródbłonka EA.hy 926 do wzrostu po 19 godz. hodowli.
FIG. 2. Effect of selected biomaterials on the ability of endothelial cells EA.hy 926 to grow after 19 hrs of culture.



RYS. 3. Typowy żel 2D uzyskany z rozdziału lizatu białkowego komórek śródbłonka hodowanych przez 24 godz. w standardowych warunkach hodowli w obecności stali medycznej oraz w obecności NCD. Zaznaczono obszary zawierające białka o zwiększonej ekspresji w stosunku do kontroli.

FIG. 3. Representative 2D-gels of protein lysates of human endothelial cells grown for 24 hours at standard conditions, in the presence of medical steel or NCD. Circled areas indicate the proteins, that were expressed at a different amount when compared to control cells.

biomaterials, taken under a fluorescence microscope are shown in FIG. 2.

The above images are considered representative for the endothelial cell growth on the examined biomaterials. Control cells were grown in the tissue culture plates in the absence of any biomaterials. Long term contact of endothelial cells with different artificial surfaces, like biomaterials, had various effects on their adhesive properties. The studied biomaterials can be arranged according to a decreased cell number in a following sequence: crude medical steel, polished medical steel, NCD coating polished medical steel, NCD coating titanium alloy, titanium alloy and TiN. This study may be helpful in a selection of biomaterials according to the requirements for the endothelial cells grow on the surface of the implants. Another aim of this study was to test a potential effect of biomaterials on possible changes in protein expression in endothelial cells. Indeed, a separation of endothelial cell proteins with two-dimensional electrophoresis revealed differences in protein pattern of cells cultured in the presence or in the absence of biomaterials (FIG. 3).

There was an increased protein expression, observed after 24 hours incubation, both in cells grown in the presence of medical steel and those cultured with NCD when compared to the control (circled area in FIG. 3). Changes in protein expression were also observed by Carcincic et. al [4]. In osteoblasts having a contact with titanium implants

stal medyczna pokryta NCD, stop tytanu pokryty NCD, stop tytanu i TiN. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość selekcji biomateriałów pod kątem potrzeb adhezji komórek śródblonka.

Celem tych badań było również oszacowanie skali zmian w ekspresji białek w komórkach śródblonka hodowanych w obecności biomateriałów. Rozdzielały białek wykonane z użyciem elektroforezy dwukierunkowej, wykazały istnienie różnic w profilach białkowych komórek śródblonka hodowanych w kontakcie z biomateriałami lub bez takiego kontaktu (RYS. 3).

Zarówno w przypadku komórek inkubowanych przez 24 godziny w obecności stali medycznej, jak i w obecności NCD, w obrazie białkowym obserwuje się ekspresję dodatkowych, w stosunku do kontroli, białek (obszary zakreślone na RYS. 3). Zmiany w ekspresji niektórych genów obserwował Carinci ze współpracownikami [4]. Wykazali oni istotne obniżenie ekspresji wielu genów w osteoblastach mających kontakt z implantami tytanowymi. Różnice w odpowiedzi poszczególnych typów komórek na kontakt z materiałem implantu skłaniają do uwagi i dalszych badań. Chociaż kontakt komórek śródblonka z NCD prowadzi do ekspresji dodatkowych białek w stosunku do kontroli, to jednak kontakt ze stalą medyczną powodował większe zmiany w profilu białkowym. Kolejnym, interesującym etapem naszych poszukiwań będzie próba identyfikacji białek, których ekspresja ulega zmianie pod wpływem kontaktu z biomateriałami.

Podziękowania

Praca powstała dzięki współpracy Centrum Doskonałości MolMed oraz Centrum Doskonałości NANODIAM, finansowanych z funduszy Unii Europejskiej.

•••••

BADANIA WARSTW WĘGLOWYCH WYTWORZONYCH NA STOPACH MAGNEZU METODĄ PACVD

MARCIN GOŁĄBCZAK*, PATRICE COUVRAT**

*POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ,
PÓLSKA

**ÉCOLE CATHOLIQUE D'ARTS ET MÉTIERS, 40 MONTÉE ST
BARTHÉLEMY, 69321 LYON, FRANCJA

Streszczenie

W pracy przedstawiono metodę wytwarzania warstw węglowych na stopie magnezu AZ31 oraz wybrane wyniki badań dotyczące ich właściwości ochronno-dekoracyjnych. Do wytwarzania warstw węglowych zastosowano metodę PACVD (Plasma Activated Chemical Vapour Deposition), polegającą na rozkładzie metanu w plazmie wysokiej częstotliwości. Prezentowane wyniki badań obejmują: identyfikację wytworzonych warstw węglowych na stopie magnezu, ocenę mikroskopową powierzchni tych warstw oraz testy ich odporności korozyjnej.

the authors have shown a number of genes with downregulated expression. The differences in a response of different cells to a contact with implants require an attention and additional research. Although a contact of endothelial cells with NCD coating results in expression of additional proteins, when compared to the control (not treated cells), an use of medical steel produces still much more changes in the protein pattern. The next, very interesting, stage of our study will be devoted to an identification of proteins subjected to changes in expression after the contact with different biomaterials.

Acknowledgements

This work has been carried out in a cooperation between Centre of Excellence MolMed and Centre of Excellence NANODIAM, both financed by the EU.

Piśmiennictwo

References

- [1] Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB: Permanent cell line expressing factor VIII related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci USA; 80, (1983), 3734-3737.
- [2] O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, (1975), 4007-4021.
- [3] Berkelman T. et al. 2D Electrophoresis. Principles and Methods. Amersham Biosciences, 1998.
- [4] Carinci F. et al. Analysis of osteoblast-like MG63 cells' response to a rough implant surface by means of DNA microarray. J Oral Implantol. 2003, 29(5), 215-20.

INVESTIGATIONS OF CARBON LAYERS MANUFACTURED ON MAGNESIUM ALLOYS USING PACVD METHOD

MARCIN GOŁĄBCZAK*, PATRICE COUVRAT**

*TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, STEFANOWSKIEGO 1, 90-924
ŁODZ, POLAND

**ÉCOLE CATHOLIQUE D'ARTS ET MÉTIERS, 40 MONTÉE ST
BARTHÉLEMY, 69321 LYON, FRANCE

Abstract

In the paper the method of manufacturing of carbon layers on A31 magnesium alloy and selected results concerning their decorative and protective properties have been presented. For manufacturing of carbon layers the Plasma Activated Chemical Vapour Deposition method has been applied. The idea of this technology has consisted in the process of excite of dense plasma in methane in a radio frequency field 13,56 MHz at a gas pressure 10-20Pa. Presented investigation results has included: identification of carbon layers manufactured on magnesium alloy, their

Wprowadzenie

Magnez jest ósmym pod względem zasobności metalem występującym w przyrodzie. Zasoby magnezu szacuje się na około 1,93% masy skorupy ziemskiej i 0,13% masy oceanów [1, 2]. Należy on do grupy metali ultralekkich (1,75 g/cm³) i w połączeniu z innymi metalami (np.: aluminium, cynk, mangan) tworzy stopy, które są bardzo atrakcyjnym materiałem konstrukcyjnym znajdującym szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach przemysłu, gdzie redukcja masy ma zasadnicze znaczenie [1, 2, 4]. Przykładowymi obszarami zastosowania stopów magnezu są: przemysł lotniczy, kosmiczny, motoryzacyjny, elektroniczny, produkcja sprzętu sportowego itd. Podejmowane są również próby wykorzystania stopów magnezu w medycynie do wytwarzania implantów. Stopy magnezu wykazują jednakże małą odporność na zużycie i działanie czynników korozjacyjnych, zakłócają pole elektromagnetyczne oraz są mało odporne na wysoką temperaturę, co w istotnym stopniu ogranicza ich stosowalność [1, 4]. Wyeliminowanie tych wad jest uwarunkowane wytworzeniem na ich powierzchni specjalnych warstw tworzących bariery ochronne. Istotnym wymaganiem użytkowym warstw ochronnych na stopach magnezu są także ich walory dekoracyjne.

W pracy zaprezentowano metodę PACVD (Plasma Activated Chemical Vapour Deposition) zastosowaną do wytwarzania warstw węglowych na stopie magnezu AZ31 oraz podano przykładowe wyniki badań, dotyczące oceny właściwości użytkowych warstw węglowych, które wykonano w École Catholique d'Arts et Métiers (ECAM) - Lyon, w laboratorium materiałoznawstwa, pod merytoryczną opieką profesora Patrice Couvrat [2].

Celem prezentowanych wyników badań była identyfikacja i pomiar grubości wytworzonych warstw węglowych oraz ocena ich odporności korozjowej na podstawie pomiarów potencjostatycznych [2].

Metoda i warunki badań

Warstwy węglowe na stopach magnezu AZ31 wytwarzano metodą PACVD, polegającą na rozkładzie metanu w plazmie wysokiej częstotliwości 13,56 MHz, uzyskiwanym przy ciśnieniu 10-20 Pa [2, 3]. Do wytwarzania warstw węglowych zastosowano stanowisko badawcze, którego głównymi zespołami są: reaktor plazmowy, elektroda wysokiej częstotliwości, układ próżniowy, układ dozowania gazu oraz układ pomiarowo-sterujący.

Do badań użyto próbek o wymiarach o 50 x 4 mm wyciętych z pręta ze stopu magnezu AZ31 hp (dostarczonego przez firmę WEBER METAUX - Francja). Proces przygotowania próbek obejmował trzy etapy. Pierwszy etap polegał na wstępny polerowaniu próbek na polerce Presi P-255 S firmy Mecapol, z użyciem wodnych papierów ściernych Buehler P 600 SiC (o ziarnistości 35 μm) i P 1200 SiC (o ziarnistości 15 μm). Drugi etap polegał na dokładnym polerowaniu próbek na polerce Presi Mecapol 2B, wyposażonej w tarcze polerskie Presi HS blue o bardzo małej ziarnistości ścierniwa (6 μm) i tarcze polerskie Presi TFR (o ziarnistości 1 mm) oraz w obecności diamentowych past polerskich Presi LD 33 (o ziarnistości 6 μm i 1 μm). Końcowym etapem przygotowania próbek było ich oczyszczenie w myjce ultradźwiękowej w obecności alkoholu etylowego. Powierzchnia próbek po tym końcowym etapie miała lustrza-

microscopic estimation and corrosion resistance.

Key words: magnesium alloys, PACVD method, carbon layers, corrosion resistance
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 24-28]

Introduction

Magnesium is the 8th most abundant element on the earth making up approximately 1.93% by mass of the earth's crust and 0.13% by mass of the oceans. It is ultralight metal with density of 1.75 g/cm³ and together with other metals (e.g.: aluminum, zinc, manganese) forms alloys which are very attractive constructional material. In particular its high strength makes it an ideal metal for automotive applications, electronics and production of sporting goods, where weight reduction is of significant concern. Magnesium has even been suggested for use as an implant metal due to its low weight and inherent biocompatibility. Unfortunately, magnesium alloys have a number of undesirable properties including poor corrosion and wear resistance, bad influence on magnetic field and low resistance on high temperature that have hindered their widespread use in many applications [1, 4]. One of the most effective ways to avoid all these disadvantages is to coat the base material. Coatings can protect a substrate by providing a barrier between the metal and its environment. Also decorative quality is a substantial useful requirement of protective layers manufactured on magnesium alloys.

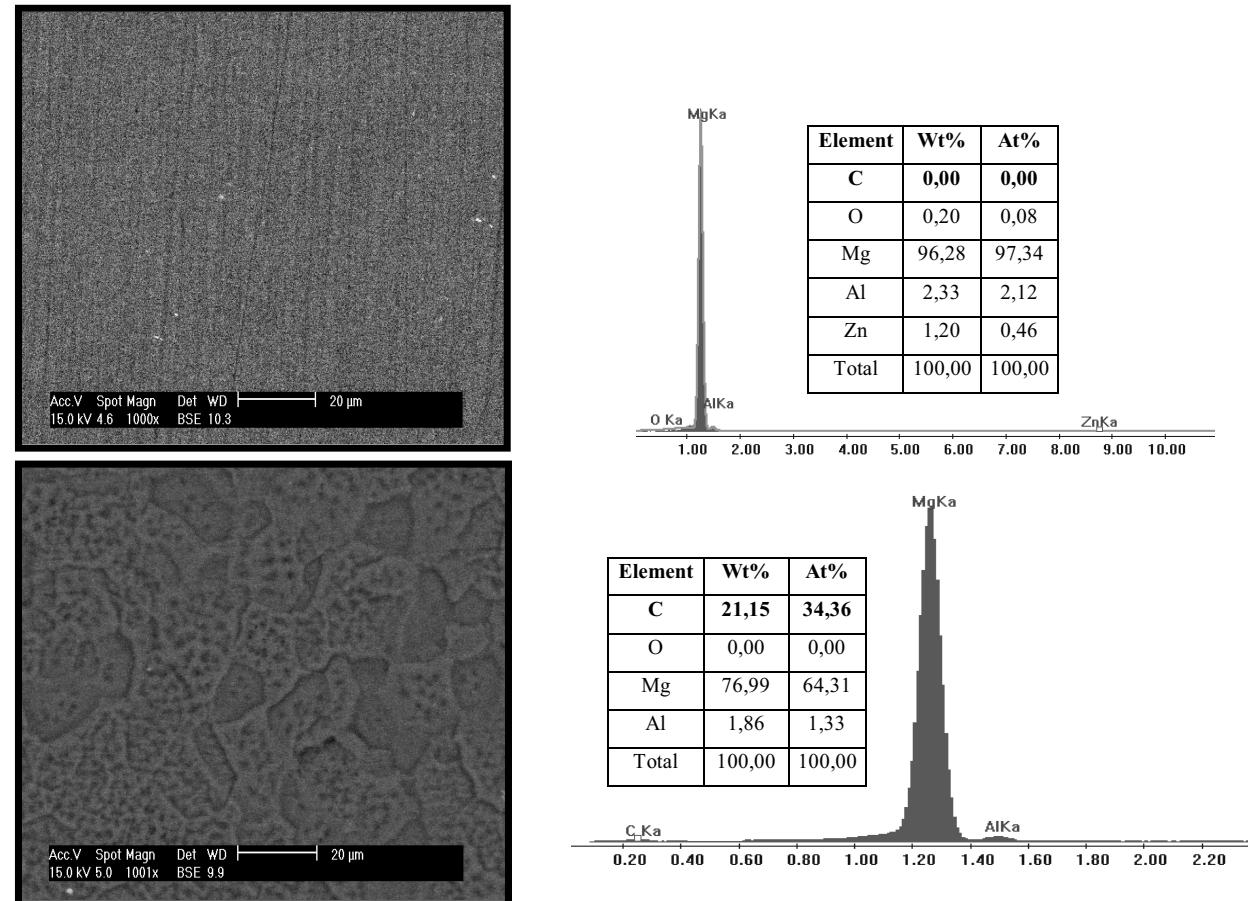
In the paper the Plasma Activated Chemical Vapour Deposition (PACVD) method used for manufacturing of carbon layers on AZ31 magnesium alloy and exemplary investigation results concerning assessment of operational properties of carbon layers obtained in École Catholique d'Arts et Métiers (ECAM) - Lyon-France have been presented [2].

The aim of presented investigation results was especially identification and measurement of thickness of manufactured carbon layers and assessment of their corrosion resistance basing on potentiostatic tests [2].

Method and investigation conditions

For manufacturing of carbon layers the Plasma Activated Chemical Vapour Deposition (PACVD) method has been used. The idea of this technology has consisted in the process of excite of dense plasma in methane in a radio frequency field 13.56 MHz at a gas pressure 10-20 Pa [2, 3]. The PACVD device consists of plasma reactor, high frequency electrode, vacuum system, gas batching system, cooling system and control system.

For investigations samples size o 50 x 4 mm cut from the high purity AZ31 magnesium alloy bar, delivered by firm WEBER METAUX - France have been used. Preparation process of surfaces of AZ31 magnesium alloy samples has included three stages. First stage has consisted in initial polishing of the samples on polishing machine Mecapol Presi P-255 S, using water abrasive papers Buehler P 600 (SiC 35 μm) and P 1200 (SiC 15 μm). Second stage has consisted in precise polishing on polishing machine Mecapol Presi 2B equipped with buffing wheels Presi HS blue (6 μm) and Presi TFR (1 mm) and in presence of diamond abrasive compounds Presi LD 33 (6 μm and 1 μm). In the final stage the samples have been ultrasonically cleaned in presence of ethyl alcohol. The surface of the samples after this final stage has had shining, silver colour, without any



RYS. 1. Porównanie obrazów SEM i wyników analizy rentgenometrycznej próbek ze stopu magnezu AZ31: a) bez warstwy węglowej, b) po wytworzeniu warstwy węglowej.

FIG. 1. Comparison of SEM images and X-ray microanalysis of AZ31 magnesium alloys: a) without carbon layer, b) after manufacturing of carbon layer.

ny, srebrzysty kolor, bez widocznych zarysowań.

Proces wytwarzania warstw węglowych obejmował dwa etapy, z których pierwszy dotyczył jonowego trawienia pokrywanych powierzchni ze stopu magnezu, natomiast drugi wytwarzania warstw węglowych. Poszczególne etapy procesu różnicowano potencjałem elektrody wysokiej częstotliwości oraz czasem trwania procesu [2,3]. W prezentowanej pracy zawarto wyniki badań warstw węglowych, wytworzonych w najkorzystniejszych warunkach procesu PACVD:

- trawienie jonowe: potencjał autopolaryzacji - 850 V, czas trawienia - 5 min, ciśnienie robocze - 10 Pa, przepływ CH₄ - 5 sccm;
- wytwarzanie warstw węglowych: potencjał autopolaryzacji - 800 V, czas nanoszenia - 10 min, ciśnienie robocze - 20 Pa, przepływ CH₄ - 40 sccm.

Wyniki badań

Zakres prezentowanych wyników badań obejmuje: identyfikację wytworzonych warstw węglowych metodą mikroanalizy rentgenowskiej SEM, pomiary grubości warstw węglowych metodą przekroju poprzecznego na mikroskopie skaningowym SEM oraz ocenę odporności korozystycznej warstw węglowych na podstawie pomiarów potencjostatycznych [2].

Przykładowe wyniki, dotyczące identyfikacji powierzch-

ny, srebrzysty kolor, bez widocznych zarysowań.

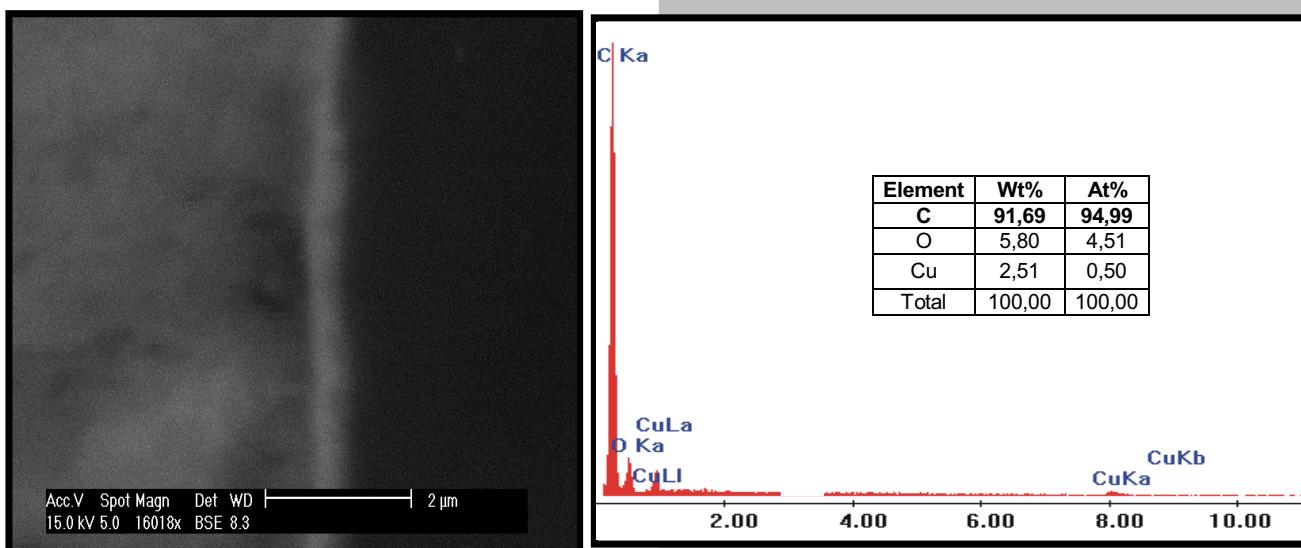
Process of manufacturing of carbon layers has consisted in two stages: ion etching of surfaces of AZ31 magnesium alloy samples and manufacturing of carbon layers. Each stages have been differentiated by self-bias of electrode of high frequency and time of the process [2,3]. In the paper investigation results obtained in the best conditions of PACVD process have been depicted:

- ion etching: self-bias - 850V, time of the process - 5 min, pressure in the reactor - 10 Pa, flow of CH₄ - 5 sccm;
- manufacturing of carbon layers: self-bias - 800 V, time of the process - 10 min, pressure in the reactor - 20 Pa, flow of CH₄ - 40 sccm.

Investigation results

The range of presented investigations has included: identification of manufactured carbon layers using X-ray microanalysis, measurement of thickness of carbon layers basing on transverse section method using scanning electron microscope (SEM) and assessment of corrosion resistance of carbon layers basing on potentiostatic tests [2].

Exemplary investigation results concerning identification of surface of AZ31 magnesium alloy after polishing process and with manufactured carbon layers have been presented in FIG. 1. They have included comparison of structures of surfaces, X-ray microanalysis diagrams and composition



RYS. 2. Obraz SEM przekroju poprzecznego próbki z warstwą węglową i wyniki analizy rentgenometrycznej.
FIG. 2. SEM images of cross section of the sample with carbon layer and results of X-ray microanalyze.

ni próbki ze stopu magnezu AZ31 po procesie polerowania, i z wytworzoną warstwą węglową przedstawiono na RYS. 1. Obejmują one porównanie obrazów struktur powierzchni, wykresów mikroanalizy rentgenowskiej i składów jakościowych zidentyfikowanych pierwiastków próbek przygotowanych do procesu PACVD (RYS. 1a) i po tym procesie (RYS. 1b).

Wykazane różnice w obrazach struktury powierzchni porównywanych próbek (na RYS. 1a - widnieją kierunkowe ślady po obróbce polerowania, natomiast na RYS. 1b - widoczna jest bardzo rozdrobniona, nieregularna struktura punktowa) oraz stwierdzona metodą rentgenometryczną zawartość węgla w próbce po procesie PACVD (RYS. 1b), potwierdzają fakt wytworzenia w tym procesie warstw węglowych na stopie magnezu AZ31.

Pomiar grubości wytworzonych warstw węglowych na próbkach magnezu wykonano metodą przekroju poprzecznego próbki, przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego firmy Philips model XL30i wyposażonego w mikroanalizator rentgenowski firmy EDAX [2]. Przygotowanie próbek do pomiaru polegało na dokładnym ich przecięciu (w przekroju prostopadłym do wytworzonej warstwy węglowej) drobnoziarnistą ściernicą diamentową, ich zatopieniu w mieszaninie sproszkowanej miedzi i termoutwardzalnego polimeru, a następnie bardzo dokładnym polerowaniu mierzonej strefy próbki.

Wyniki pomiaru grubości warstwy węglowej przedstawiono na RYS. 2. Prezentowany na RYS. 2. obraz SEM ujawnia jasną strefę stanowiącą warstwę węglową. Różnicuje ją z jednej strony warstwa miedzi - koloru ciemnego (miedź charakteryzuje się bardzo dobrą przewodnością elektryczną), z drugiej zaś warstwa koloru szarego - stanowiąca podłożę próbki stopu magnezu (magnez, bowiem zakłada pole elektryczne). Oszacowana na podstawie obrazu SEM oraz wyników analizy rentgenometrycznej grubość wytworzonej warstwy węglowej na stopie magnezu AZ31 wynosiła około $0,5 \mu\text{m}$.

Odporność korozyjną warstw węglowych wytworzonych na stopie magnezu AZ31 oceniano na podstawie elektrochemicznych pomiarów potencjostatycznych, wykonanych na stanowisku badawczym VoltaMaster1 wyposażonym w potencjostat firmy Radiometr-Copenhagen PGP 201 oraz testów w komorze solnej [2]. Prezentowane tu wyniki badań dotyczą pomiarów potencjostatycznych, które przed-

of elements of samples prepared for PACVD (FIG. 1a), and after this process (FIG. 1b).

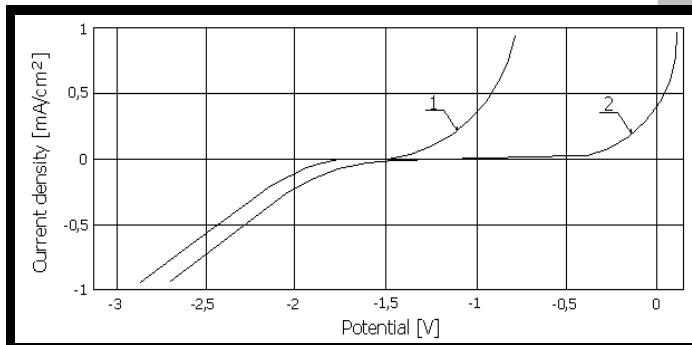
Revealed differences in images of compared surfaces of the AZ31 magnesium alloy samples (FIG. 1a - visible traces after polishing process, FIG. 1b - visible very crumbled, irregular structure) and carbon content in sample after PACVD process, basing on X-ray microanalyze (FIG. 1b), have confirmed the fact of manufacturing of carbon layer on AZ31 magnesium alloy.

The measurement of thickness of carbon layers basing on transverse section method has been done using scanning electron microscope (SEM) Philips XL30i equipped with EDAX X-ray microanalyser [2]. Preparation of surfaces for measurement has consisted in its precisely cut (across the manufactured carbon layer) using fine-grained diamond grinding wheel, submergence in solution of powdered copper and thermo hardening polymer, and finally very accurate polishing of measured area of the sample.

Investigation results concerning measurement of carbon layer have been presented in FIG. 2. SEM images presented in FIG. 2 have shown the bright area of carbon layer. This area has been differentiated on one side by dark copper layer (copper has been characterized by very good electrical conductivity), and on the other side by gray colour of magnesium alloy (since magnesium has had bad influence on magnetic field). The estimated thickness of carbon layer manufactured on AZ31 magnesium alloy basing on SEM pictures and X-ray microanalyze has been equaled to about $0,5 \mu\text{m}$.

Corrosion resistance of carbon layers manufactured on AZ31 magnesium alloy has been estimated on the ground of electrochemical potentiostatic measurements. For the corrosion tests the VoltaMaster1 stand equipped with potentiostat Radiometr-Copenhagen PGP 201 has been used. [2]. The potentiostatic investigation results have been presented in FIG. 3. The investigation results obtained (FIG. 3) have shown that AZ31 magnesium alloy sample with manufactured on its surface carbon layer has had about 250% higher anodic breakdown potential (curve-2), in compare to sample without this layer (curve-1).

This fact has confirmed that a sample with manufactured carbon layer using PACVD method has had much higher corrosion resistance.



RYS. 3. Porównanie krzywych potencjostatycznych próbek ze stopu magnezu AZ31: 1 - próbki przygotowanych do wytwarzania warstw węglowych metodą PACVD, 2 - próbki z wytworzoną na ich powierzchni warstwą węglową.
FIG. 3. Comparison of potentiostatic curves for AZ31 magnesium alloy samples: 1 - sample prepared for manufacturing of carbon layer, 2 - sample with manufactured on its surface carbon layer using PACVD method.

stawiono na RYS. 3. Wyniki pomiarów potencjostatycznych wskazują (RYS. 3), że próbka ze stopu magnezu AZ31 z warstwą węglową posiadała około 250% wyższą wartość potencjału przebicia (krzywa - 2), w porównaniu do próbki bez tej warstwy (krzywa - 1). Ten fakt potwierdza istotny wzrost odporności korozyjnej próbki z warstwą węglową wytworzoną metodą PACVD.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania umożliwiły wytworzenie warstw węglowych na stopie magnezu AZ31 metodą PACVD oraz sprawdzenie ich właściwości użytkowych. Dokonano identyfikacji wytworzonych warstw węglowych na powierzchni próbek ze stopu magnezu oraz określono ich grubość (wynoszącą około $0,5 \mu\text{m}$). Wytwarzane tą metodą warstwy węglowe wykazywały istotny wzrost odporności korozyjnej. Cechą ta znacznie podnosi przydatność stopów magnezu w zastosowaniach medycznych, zwłaszcza w implantologii, gdzie dodatkowym atutem jest niska masa stopów.

Summary

The investigations carried out have enabled to manufacture carbon layers on AZ31 magnesium alloy using PACVD method and test their operational properties.

Also the identification of manufactured carbon layers on surfaces of AZ31 magnesium alloy samples and estimation of their thickness (equal to about $0,5 \mu\text{m}$) have been done. Manufactured carbon layers using PACVD method have been characterized by very good corrosion resistance, what is very important for medical application especially for implantology.

Piśmiennictwo

- [1] Hollstein F., Wiedemann R., Scholz J.: Characteristics of PVD-Coatings on AZ31hp Magnesium Alloys. Proceedings of 29th International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films. California, USA, 2002.
- [2] Gołąbczak M., Couvrat P.: Investigations of carbon layers manufactured on magnesium alloys using PACVD method. Investigation Report, Ecam 2004.
- [3] Gołąbczak M., Niedzielski P.: Wytwarzanie warstw nanokrystalicznego diamentu na stopie magnezu. Wybrane zagadnienia obróbek skoncentrowanym strumieniem energii, Bydgoskie Towarzystwo Naukowe, Bydgoszcz 2003 s. 260-265.
- [4] Gray J.E., Luan B.: Protective Coatings on Magnesium and its alloys-a critical review. Journal of Alloys and Compounds, no 336/2002, pp. 88-113.

References

WYTWARZANIE WARSTW WĘGLOWYCH W NOWYM REAKTORZE MW/RF

W. KACZOROWSKI, P. NIEDZIELSKI, S. MITURA

CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM,
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA
WITEKK@P.LODZ.PL

Streszczenie

Warstwy węglowe wytwarzono metodą dwuczęstotliwościową (MW/RF PCVD - microwave and radio frequency plasma chemical vapor deposition) z zastosowaniem częstotliwości radiowej i mikrofalowej. Optymalizacja parametrów procesu umożliwiła nanoszenie jednorodnych powłok na stali AISI 316 L. War-

MANUFACTURE OF CARBON COATING FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS IN A NEW MW/RF REACTOR

W. KACZOROWSKI, P. NIEDZIELSKI, S. MITURA

CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM,
BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION,
INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND, WITEKK@P.LODZ.PL

Abstract

Carbon films were prepared in microwave and radio frequency plasma reactor using dual frequency

stwy zostały wytworzone przy wykorzystaniu różnych mieszanin gazów (metanu - CH_4 albo metanu z argonem - CH_4/Ar). Analiza morfologii i struktury uzyskanych powłok przeprowadzona została z wykorzystaniem technik: mikroskopu optycznego, skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) i mikroskopu sił atomowych (AFM). Do identyfikacji składu fazowego wytwarzanych warstw zastosowano spektroskopię ramanską. W pracy tej zostały opisane szczegóły eksperymentu oraz uzyskane wyniki.

Słowa kluczowe: warstwy węglowe, technika MW/RF PCVD, nanokrystaliczny diament

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 28-31]

Wstęp

Warstwy węglowe nanoszone są na różnorodnych podłożach z zastosowaniem wielu fizycznych [1, 2] i chemicznych [3,4] technik wytwarzania. Powłoki w postaci nanokrystalicznego diamentu (NCD) posiadają bardzo interesujące właściwości, takie jak: wysoką twardość i odporność na zużycie, niski współczynnik tarcia, chemiczną obojętność oraz dobrą biokompatybilność. Kombinacja wymienionych właściwości sprawia, że warstwy te są atrakcyjnym materiałem dla zastosowań biomedycznych [5, 6]. Właściwości powłok węglowych zależą od stosunku pomiędzy ilością występujących w warstwie atomów o hybrydyzacji sp^2 (wiązań typu grafitowego) i sp^3 (wiązań typu diamentowego).

Obiecujące medyczne zastosowania warstw węglowych wytwarzanych metodą RF PCVD (radio frequency plasma chemical vapor deposition) zostały potwierdzone w badaniach Mitury i Niedzielskiego [7, 8]. W prezentowanej pracy analizowano powłoki węglowe wytwarzane w reaktorze MW/RF.

Szczegóły eksperymentu

Przygotowanie próbek

Zastosowane w prezentowanej pracy podłożo ze stali AISI 316 L szlifowano, elektropolerowano, czyszczono metanolom w laźni ultradźwiękowej i suszono. Każdy proces wytwarzania poprzedzało 10 minutowe czyszczenie powierzchni z użyciem obojętnej plazmy argonowej w komorze reaktora.

Stanowisko eksperymentalne

W badaniach analizowano warstwy węglowe naniesione z zastosowaniem nowego systemu wytwarzania MW/RF PCVD, którego schemat i widok pokazano na RYSUNKACH 1 i 2.

Podczas procesów zastosowano szerokie zakresy parametrów: moc mikrofalową od 0 do 250 W, moc RF od 0 do 500 W, odpowiadającą poziomowi potencjału autopolaryzacji od 0 do 700 V. Próbki montowano na elektrodzie (o średnicy 200 mm), do której został podłączony generator o częstotliwości radiowej 13,56 MHz. Moc MW była dostarczana przez kwarcową rurę umieszczoną w górnej części reaktora, po przeciwniej stronie elektrody. Metan (CH_4), albo mieszaninę metanu z argonem (CH_4/Ar), doprowadzano do reaktora z przepływami 20-80 sccm ($0,33\text{-}1,33 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{s}$). Metan jako gaz roboczy rozprowadzano prysznikiem, który znajdował się blisko uchwytu na próbki. Argon, gaz plazmotwórczy, dostarczany przez rurę kwarcową. Komorę reaktora odpompowywano do ciśnienia około kilku Pa. Podczas procesów kontrolowano: całkowite ciśnienie, moc częstotliwości radiowej i mikrofalowej, przepływy gazów Ar i CH_4 oraz czas wytwarzania. Każdorazowo moc RF i MW była tak dostosowywana, aby osiągnąć minimalną wartość mocy odbitej.

method (MW/RF PCVD -microwave and radio frequency plasma chemical vapour deposition). The parameters of the deposition were optimised to get uniform films on the stainless steel AISI 316 L. These films were obtained from different mixtures of gases (methane - CH_4 or methane/argon- CH_4/Ar). Optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM) techniques were used to analyse the morphology and structure of deposited layers. Raman spectroscopy was performed to identify phases present in the films. In this paper experimental details and results were described.

Key words: carbon layers, MW/RF PCVD technique, nanocrystalline diamond

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 28-31]

Introduction

Carbon coatings are deposited on various substrates by many of physical [1, 2] and chemical [3, 4] vapour deposition techniques. Nanocrystalline diamond (NCD) have very interesting characteristics such as: high hardness and wear resistance, low friction coefficient, chemical inertness and good biocompatibility. A combination of these properties makes carbon film very attractive material for biomedical applications [5, 6]. Properties of carbon coatings strongly depend on the balance between sp^2 (graphite type bonds) and sp^3 (diamond type tetragonal bonds) hybridization of the atoms in the carbon layer. The promising medical applications of the carbon coatings deposited by RF PCVD (radio frequency plasma chemical vapour deposition) method, elaborated at the Technical University of Lodz, have been confirmed in Mitura and Niedzielski investigations [7, 8]. In the preliminary work we have studied NCD coatings produced by the new deposition technique MW/RF PCVD.

Experimental details

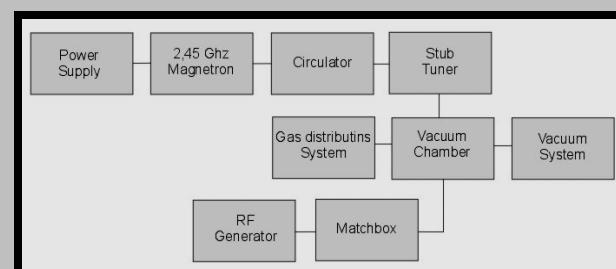
Sample preparation

Stainless steel AISI 316 L substrates used in the present study were machined, electropolished, ultrasonically cleaned in methanol and dried. Prior to NCD deposition, the surface were cleaned in an argon inert plasma in the vacuum chamber for 10 minutes.

Experimental equipment

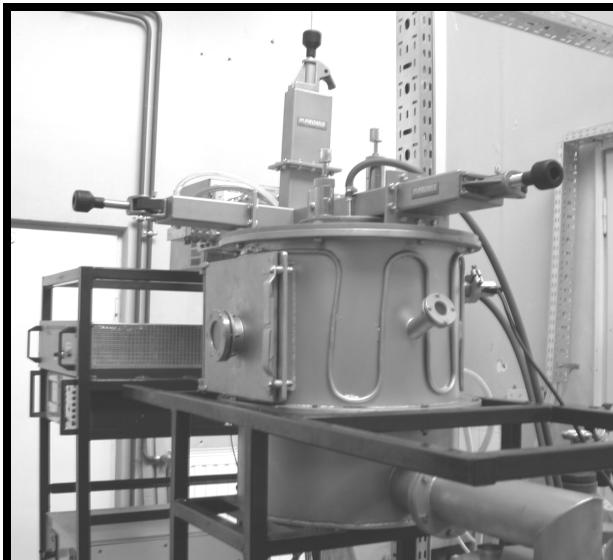
In the preliminary work we have studied NCD coating produced by the new deposition technique MW/RF PCVD. A schematic diagram and the picture of plasma MW/RF PCVD system used in this study was shown in FIGURES 1 and 2.

In investigations a wide range of parameters: microwave power from 0 to 250 W, RF power from 0 to 500W, corresponding to bias voltage values in range from 0 to -700V



RYS. 1. Schemat systemu MW/RF PCVD.

FIG. 1. Schematic diagram of the MW/RF PCVD system.

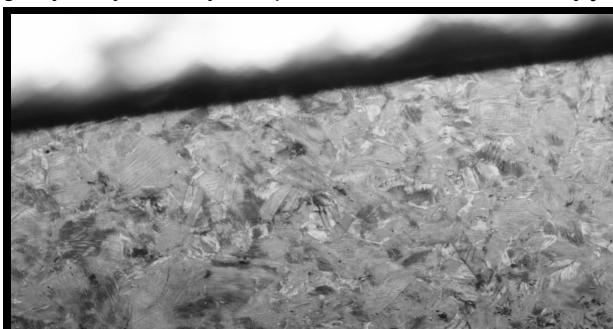


RYS. 2. Widok systemu MW/RF PCVD.
FIG. 2. A view of the MW/RF PCVD system.

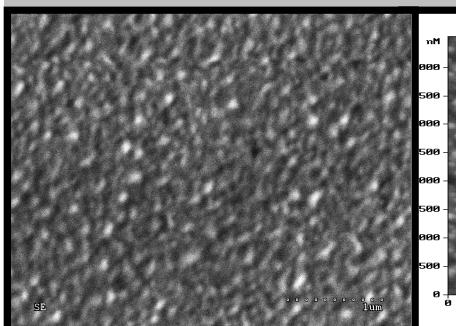
Wyniki

Wstępna analiza wytworzonych warstw została przeprowadzona w oparciu o mikroskop optyczny. Badania te potwierdziły, że możliwe było nanoszenie jednolitych powłok (RYS. 3).

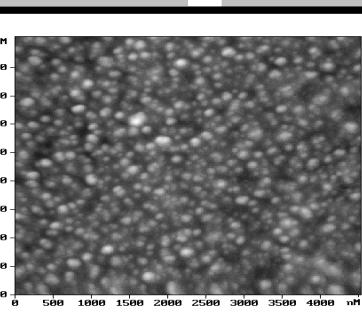
Na RYSUNKU 4A pokazano zdjęcie SEM warstw węglowych wytworzonych w plazmie MW/RF. Ta interesująca



RYS. 3. Widok warstwy węglowej. Powiększenie 20x.
FIG. 3. A view of carbon layers. Magnification 20x.



RYS. 4A. Obraz SEM warstwy węglowej z plazmy MW/RF.
FIG. 4A. SEM picture of carbon coating deposited by MW/RF plasma.



RYS. 4B. Obraz AFM warstwy węglowej z plazmy MW/RF.
FIG. 4B. AFM picture of carbon coating deposited by MW/RF plasma.

have been used. The substrates were mounted on the electrode (200 mm diameter). A radio-frequency generator, with an operating frequency 13.56 MHz, was connected to electrode. The MW power was applied through a quartz tube, which is on the top of the stainless steel reactor, opposite the RF electrode. Methane - CH₄ or methane/argon - CH₄/Ar mixtures were introduced into the reactor at flow rate 20 - 80 sccm (0.33 - 1.33 × 10⁻⁶ m³/s). Methane was used as a precursor gas and was introduced in the shower close to the substrate holder. Argon - plasma gas was fed into the quartz tube. The chamber was evacuated to the pressure of several Pa. The total pressure, microwave power, radio frequency power, Ar and CH₄ flow rate and time of deposition were controlled. The MW and RF power were adjusted till the reflected power was brought to minimum.

Results

For preliminary analysis of manufactured carbon films the optical microscope has been used. This investigations have shown, that it was possible to create the uniform coatings (FIG. 3).

SEM image of carbon coatings manufactured in MW/RF plasma, was shown in FIGURE 4A. These interesting nanostructures were confirmed on the AFM image (FIG.4B). The typical values for roughness in these carbon films were varied from 10 to 12 nm. The size of grains was varied from 80 to 200 nm

Raman measurements of NCD films were performed with a T-64000 Yobin-Yvon spectrometer using a 514.5 nm argon ion laser light. The Raman spectra of carbon films deposited by MW/RF PCVD process with different CH₄/Ar mixtures were fitted using Gauss-Lorentz curves with two peaks as shown in FIGURE 5 and 6.

The spectrum of NCD films was dominated by the G (graphite) peak at 1590 cm⁻¹ and D (diamond) peak around 1350 cm⁻¹. These results have shown, that there was possibility to create NCD coatings with high sp³ bond connect. It was found, that the argon concentration about 40% in CH₄/Ar mixture promoted formation of the sp³ hybridization. The investigations characterized the intensity ratio of the D band to the G band (ID/IG) in the Raman spectra. It was noted, that the ID/IG increased from 1.61 (for films deposited from CH₄) to 1.75 (for films deposited from CH₄/Ar mixtures).

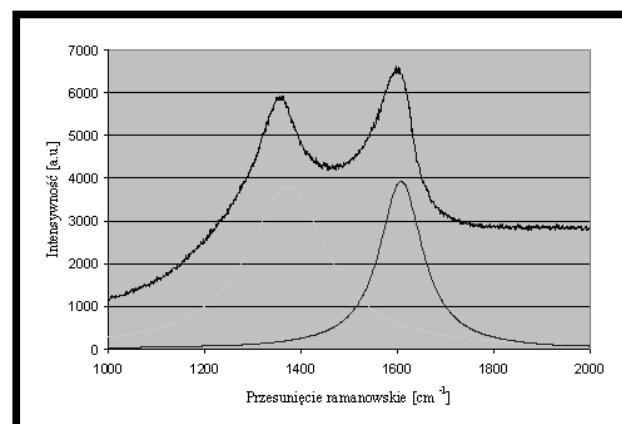
Conclusions

New MW/RF reactor have been successfully used to deposit of carbon films. The investigations have shown,

nanostruktura została potwierdzona także na zdjęciach AFM (RYS. 4B). Typowa wartość chropowatości prezentowanych powłok wahała się od 10 do 12 nm, natomiast wielkość uzy- skiwanych ziaren od 80 do 120 nm.

Badania ramanowskie warstw NCD przeprowadzone zostały w oparciu o spektrometr T-64000 Yobin-Yvon, wykorzystujący laser argonowy o długości fali 514,5 nm. Uzyskane z warstw węglowych, nanoszonych z wykorzystaniem różnych mieszanin gazów CH₄/Ar, widma Ramana zostały dopasowane krzywymi rozkładu Gaussa-Lorentza (RYS. 5, 6).

Widma NCD zostały zdominowane przez pik G (grafitowy) - przy 1590 cm^{-1} oraz D (diamentowy) - około 1350 cm^{-1} . Wyniki te pokazują, że możliwe było wytworzenie powłok NCD z wysoką zawartością fazy sp^3 . Stwierdzono, że 40% koncentracja argonu w mieszaninie CH_4/Ar sprzyja powstawaniu atomów o hybrydyzacji sp^3 . Analizując widma Raman-a scharakteryzowano stosunek intensywności widma pochodzących od wiązań typu D i G (ID/IG). Odnotowano, że ID/IG rośnie od 1,61 (dla warstw wytworzonych z CH_4) do 1,75 (dla warstw wytworzonych z mieszaniny CH_4/Ar).



RYS. 6. Widmo Ramana z warstw wytwarzanych z mieszaniny metanu i argonu.

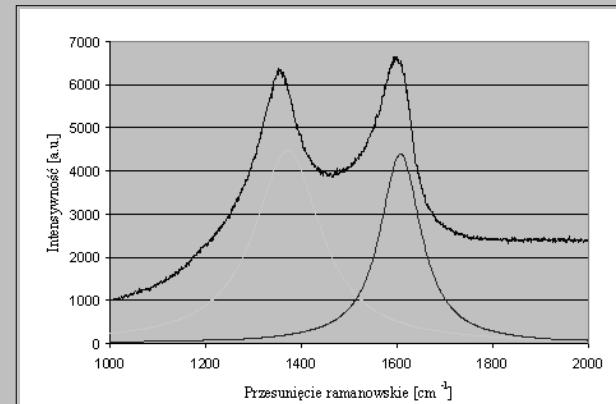
FIG. 6. Raman spectra of carbon film deposited from methane/argon mixture.

Podsumowanie

Nowy reaktor MW/RF został z sukcesem zastosowany do wytwarzania warstw węglowych. Badania pokazują, że możliwe było wytworzenie jednolitych powłok. Uzyskane warstwy posiadają bardzo interesującą strukturę. Wielkość ich ziaren wahą się do 80 do 200 nm. Wyniki spektroskopii ramanowskiej pokazują, że możliwe jest wytworzenie powłok NCD z wysoką zawartością fazy sp^3 . Dodatek argonu sprzyja powstawaniu wiązań o hybrydyzacji sp^3 co powoduje wzrost wartości stosunku ID/IG. Uzyskane nowe jednolite i jednorodne warstwy węglowe są obiecującym materiałem dla zastosowań biomedycznych.

Podziękowanie

Praca finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2005 jako zadanie badawcze zamawiane nr KBN-082/T08/09.



RYS. 5. Widmo Ramana z warstw wytwarzanych z metanu

FIG. 5. Raman spectra of carbon film deposited from methane.

that it was possible to create the uniform layers. The coatings prepared during these study have had very interesting structures. The size of grains has changed from 80 to 200 nm. Raman spectra has shown, that it was possible to create carbon films with high sp^3 contents. Addition of argon to methane have promoted formation of the sp^3 hybridization and caused an increase in the value of ID/IG. The new uniform and homogenous carbon coatings have been very promising materials for biomedical applications.

Acknowledgements

This work was financed by Polish State Committee in years 2002-2005 for Scientific Research Nr KBN-082/T08/09.

Piśmiennictwo

References

- [1] J. Bolton, X. Hu: In vitro corrosion testing of PVD coatings applied to a surgical grade Co-Cr-Mo alloy, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13 (6), June 2002, 567-574.
 - [2] Y. Ozmen, A. Tanaka, T. Sumiya: The effect of humidity on the tribological behavior of diamond-like carbon (DLC) film coated on WC-Co by physical vapor deposition method, *Surface and Coatings Technology* 133-134 (2000) 455-459.
 - [3] D. Liu, T. Ma, S. Yu, Y. Xu and X. Yang: Plasma-assisted CVD of hydrogenated diamond-like carbon films by low-pressure dielectric barrier discharges *Journal Physic D* 34, 2001, 1651-1656.
 - [4] A. Grill, B. S. Meyerson, V.V. Patel: Diamondlike carbon films by rf plasma assisted chemical vapor deposition from acetylene *Journal of research and Development*, Volume 34, Number 6, (1990) 849-852.
 - [5] D.A. LaVan, R.F. Padera, T.A. Friedmann, J.P. Sullivan, R. Langer, D.S. Kohane: In vivo evaluated of tetrahedral amorphous carbon, *Biomaterials* 26 (2005) 465-473.
 - [6] P. Yang, S.C.H. Kwok, R.K.Y. Fu, Y.X. Leng, G.J. Wan, N. Huang, Y. Leng, P. Chu: Structure and properties of annealed amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) films for biomedical applications, *Surface and Coatings Technology* 177-178 (2004) 747-751.
 - [7] Mitura S., Mitura A., Niedzielski P.: Nanocrystalline diamond coatings, *J Chaos, Solitons and Fractals* 10 (1999) 2165-2177.
 - [8] S. Mitura, P. Niedzielski, D. Jachowicz, M. Langer, J. Marciñiak, A. Stanishevsky, E. Tochitsky, P. Louda, P. Couvrat: Influence of carbon coatings orings on the properties important for biomedical application, *Diamond and related Materials* 5 (1996) 1185-1188.

32. WARSTWY DWUTLENKU TYTANU NAKŁADANE METODĄ CVD WSPOMAGANĄ PLAZMOWO DO ZASTOSOWAŃ FOTOKATALITYCZNYCH

H. SZYMANOWSKI, A. SOBCZYK, W. JAKUBOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 LODZ, POLSKA,

Streszczenie

Chemiczne osadzanie z fazy gazowej w wysokiej częstotliwości zostało wykorzystane do syntezy cienkich warstw dwutlenku tytanu. Warstwami tymi powlekano podłożą szklane i krzemowe. Jako związek wyjściowy użyto chlorek tytanu IV, a proces nakładania przebiegał w obecności tlenu. Aktywność fotokatalityczną warstw zbadano pod kątem ich właściwości bakteriobójczych. Do badań bakteriobójczych został użyty szczep bakterii *Escherichia Coli* K12 i promieniowanie UV. Właściwości optyczne wyznaczono spektrofotometrycznie, natomiast strukturę chemiczną przy użyciu spektroskopii FTIR. W niniejszej pracy przedstawiono wpływ zastosowanej mocy wysokiej częstotliwości na właściwości optyczne, strukturalne i bakteriobójcze.

Słowa kluczowe: *TiO₂, PECVD, fotokataliza, Escherichia Coli, spektroskopia FTIR*

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 32-36]

Wstęp

Istnieje wiele materiałów posiadających właściwości fotokatalityczne. Najważniejsze z nich to: ZnO, SnO₂, Fe₂O₃, CdS, ZnS oraz TiO₂ [1]. Warstwy dwutlenku tytanu ze względu na swój fotoindukcyjny charakter znajdują zastosowanie jako czynniki czyszczące, antybakteryjne oraz służące do oczyszczania powietrza i wody [2]. Dodatkowymi zaletami dwutlenku tytanu jest jego niski koszt, wysoka fotoaktywność i odpowiednia wartość przerwy optycznej ($E_g = 3,2$ eV).

Naświetlanie światłem ultrafioletowym jest bardzo często używane jako metoda dezynfekcji wody i powietrza. W tym celu głównie wykorzystywana jest, najbardziej energetyczna część promieniowania ultrafioletowego z przedziału 200-290 nm (UV-C). Jednak w niektórych przypadkach ta metoda okazuje się mało efektywna. W ostatnich latach fotokataliza z jednoczesnym użyciem UV i TiO₂ jest uznawana za innowacyjną metodę dezynfekcji, ponieważ jest ona całkowicie bezpieczna (nie powoduje ona powstania mutagenów, karcenogenów), w przeciwieństwie do chemicznych metod dezynfekcji [3]. W momencie kiedy TiO₂ zaabsorbuje energię większą od wartości jego przerwy optycznej (powyżej 3,2 eV), elektrony zostają przeniesione z powłoki walencyjnej do pasma przewodnictwa, w wyniku czego

PLASMA ENHANCED CVD DEPOSITION OF TITANIUM DIOXIDE FILMS FOR PHOTOCATALYTIC APPLICATIONS

H. SZYMANOWSKI, A. SOBCZYK, W. JAKUBOWSKI, M. GAZICKI-LIPMAN

INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 LODZ, POLAND

Abstract

*TiO₂ thin films were synthesized using Radio Frequency Chemical Vapour Deposition process (RF PECVD). The films were deposited on glass and silicon substrate. Titanium tetrachloride derivatives have been used as precursor compounds, and the processes have been carried out in the presence of oxygen. The photocatalytic activity of the formed layers was studied by means of their antibacterial property. Bactericidal properties of the coatings were studied using cultures of K12 strain of *Escherichia coli* and the UV irradiation. Optical properties of the films have been examined by means of UV-VIS investigations. Chemical structure was investigated using FTIR spectroscopy. An effect of an RF power of the discharge on the optical, structural and the bactericidal properties of the films was investigated in this work.*

Key words: *TiO₂, PECVD, photocatalyst, Escherichia coli, FTIR spectroscopy*

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 32-36]

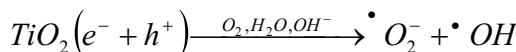
Introduction

It is known many photocatalysts semiconductors such as ZnO, SnO₂, Fe₂O₃, CdS, ZnS and TiO₂. Titanium dioxide (TiO₂) offers additional advantages: low cost, chemically inert, highly photoactive and suitable band gap ($E_g = 3.2$ eV) [1]. TiO₂ films because of its unique photoinduced characteristics have been widely studied for applications such as auto cleaning agent, antibacterial, and for purification of water and air [2].

Also ultraviolet radiation using in antimicrobial processes has received great attention. The most energetic fraction of ultraviolet spectra, corresponding to the UV-C range (200-290 nm), is commonly used as an antibacterial agent in water and air treatments. In few cases this method shows not sufficient efficiency. Photocatalysis, using UV and TiO₂, has emerged in the last years as an innovative disinfection method, because it is no dangerous (carcinogenic or mutagenic) in the contrast with chemical disinfection techniques [3]. When the TiO₂ absorbs the light with the energy greater than its band gap (above 3.2 eV), electrons in the valence band are excited to the conduction band, and create electron-hole pairs [4].

The photogenerated holes in the valence band diffuse to the surface and, due to their strong oxidizing power, quickly react with adsorbed water molecules to produce

go tworzy się para elektron-dziura [4].



Fotogenerowane dziury w powłoce walencyjnej dyfuzują do powierzchni, stanowią olbrzymią siłę utleniającą, w wyniku czego szybko reagują z zaadsorbowanymi cząsteczkami wody, co prowadzi do powstania rodników hydroksylowych ($\cdot OH$). Tymczasem elektryny znajdujące się na powłoce przewodniczące reagują z cząsteczkowym tlenem z powietrza, prowadząc do powstania rodników ponadtlenkowych (O_2^\bullet) [5,6]. Reaktywne formy tlenu, biorą udział w procesie utleniania, co w efekcie prowadzi do powstania do pewnego rodzaju ataku fotokatalizatora na żywą komórkę. Przejawia się to wzajemnym oddziaływanie z błonami komórkowymi, hamowaniem aktywności różnych enzymów, zniszczeniem materiału genetycznego (DNA) [7, 8].

W prezentowanej pracy cienkie warstwy dwutlenku tytanu były nakładane metodą PECVD na podłożą szklane i płytki krzemowe. Aktywność bakteriobójcza tych warstw silnie zależy od właściwości optycznych i strukturalnych.

Część eksperymentalna

Materiały i procedura nakładania

Wykorzystano ciekły związek wyjściowy (chlorek tytanu IV) firmy Ridel de Haën. Jako podłożo użyto mikroskopowe szkiełka nakrywkowe o rozmiarze 25 mm x 25 mm firmy Fisherbrand i płytki krzemowe o rozmiarze 10 mm x 10 mm x 1 mm.

Proces nakładania na różne podłożo przeprowadzono w reaktorze PECVD. Komora reaktora składa się z dwóch równoległych elektrod, rozdzielonych szklanymi cylindrem. Przez dystrybutory umieszczone na górnjej elektrozie prowadzany jest strumień par $TiCl_4$ rozcieńczonych argonem. Elektroda ta jest uziemiona. Drugim gazem dostarczonym tą samą drogą jest tlen. Dolna elektroda jest połączona z generatorem wysokiej częstotliwości Plasma Product RF5S poprzez układ dopasowujący. Do kontroli przepływu gazów roboczych (argonu i tlenu) używane są przepływomierze MKS 1179AX. Szybkość przepływu par $TiCl_4$ jest regulowana temperaturą prekursora, jak i przepływem argonu.

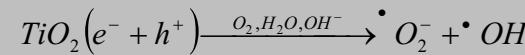
Kultury bakterii i proces naświetlania

Jako wzorcowy mikroorganizm w procesie dezynfekcji został użyty szczep bakterii Escherichia Coli K12. Komórki bakterii wzrastały w warunkach tlenowych na pożywce YPD, zawierającej 1% NaCl, 1% peptonu G, 0,5% ekstraktu drożdżowego, do momentu kiedy ich ilość wyniosła 10^6 komórki/ml. Zawiesina bakteryjna została umieszczona tak, aby utworzyła cienką warstawkę cieczy na szkiełkach pokrytych warstwami TiO_2 .

Źródło promieniowania UV znajdowało się w odległości 20 cm od naświetlanych próbek. Próbki te były naświetlane przez 2 minuty, lampą o natężeniu światła wynoszącym 16 mW/cm². Komórki bakterii liczono pod mikroskopem Olympus typ GX 71 wyposażonym w kamerę cyfrową, model DP 70. Ilość komórek bakteryjnych martwych i żywych była określona zarówno na płytach pokrytych warstwą jak i na czystym szkle jako próbie odniesienia.

Charakterystyka warstw

Właściwości optyczne (współczynnik załamania światła n, przerwa optyczna E_g) warstw TiO_2 zostały określone przez dane absorpcyjne zmierzone za pomocą spektrofotometru Ultraspec 2100 PRO w zakresie od 200 do 900 nm, używając



hydroksyl radical ($\cdot OH$). Meanwhile, electrons in the conduction band react with molecular oxygen in the air to produce the superoxide radical anion (O_2^\bullet) [5,6]. Reactive oxygen species (ROS) are involved in a variety of oxidative effects affecting cellular targets that have been implicated in the mode of action of photocatalytic TiO_2 : interaction with cellular membranes, inhibition of various enzyme activity and destruction of genetic supramolecules such as DNA [7, 8].

In the present work TiO_2 nanometers thin films were deposited PECVD method on glasses, and silica plates. The bactericidal activity of these layers depended strongly on optical and structural properties.

Experimental

Materials and deposition procedure

The liquid precursor tetrachloride titanium ($TiCl_4$) was purchased from Ridel de Haën Company. Microscope glass cover glasses (25 mm x 25 mm in size and 0,1 mm thickness) from Fisherbrand Company and a plate of silica (10 mm x 10 mm in size and 1 mm thickness), were used as the deposition substrates.

The deposition of titanium dioxide on the different materials is realized in the PECVD reactor. The chamber of this reactor consists of two parallel electrodes with a glass cylinder separating them. The upper electrode is a grounded, shower - type electrode, through which a stream of titanium tetrachloride vapor, diluted in argon, is introduced to the chamber. The second reactive gas (oxygen) is also introduced to the chamber in the same way. The lower electrode is supplied with RF power from the Plasma Products RF5S power generator through a self-made matching circuit. MKS 1179AX mass flow controllers are used to control the flow rates of gaseous media (argon and oxygen). The flow rate of titanium tetrachloride was regulated by the temperature of liquid precursor and by flow rate of argon.

Cell culture and irradiation procedure

Exponential growth phase of *Escherichia coli* strain K12 was used as a model microorganism for the disinfection studies. Cultures were grown aerobically in YPD medium, containing 1% NaCl, 1% peptone G, 0,5 % yeast extract at least until the cells count reached a 10^6 cells/ml. Suspensions of *E. coli* cells were pipetted onto TiO_2 coated glass plates and spread out to form a liquid film.

The illuminating UV light source was placed 200 mm above the sample surface. Light intensity was 16 mW/cm² and irradiation time amounted to 2 minutes. The results of the treatment were observed using Olympus GX 71 microscope equipped with digital camera, model DP70. The numbers of killed and survived bacteria cells were determined for each coating, and the uncoated glass was used as reference.

Film characterization

Optical properties (refractive index n, optical gap E_g) of TiO_2 films were determined from absorption data collected using a UV-VIS spectrophotometer Ultraspec 2100 PRO in the range of 200 - 900 nm, with air as reference. A composition of the coatings was analyzed by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) using a Bio-Rad 175 C Spectrometer.

jąc jako próbki odniesienia powietrza. Struktura chemiczna warstw analizowana była za pomocą absorpcyjnej spektrofotometrii w podczerwieni (FTIR) używając do tego celu spektrometru Bio-Rad 175C.

Wyniki i dyskusja

Dane optyczne

Właściwości optyczne warstw nałożonych na płytki szklane uznano jako kryterium ich jakości. Sporządzono zatem widma absorpcyjne UV - VIS przy różnych mocach wyładowania. Wyniki zostały zaprezentowane na RYS. 1. W TABELI 1 przedstawiono wartości przerwy optycznej E_g wraz ze współczynnikami światła n przy długości fali 550 nm dla próbek nakładanych przy czterech różnych mocach. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno przerwy optyczne jak i współczynniki załamania światła wzrastają wraz ze wzrostem zastosowanej mocy wyładowania. Otrzymane wartości są zbliżone do danych literaturowych [9, 10].

Moc Power [W]	Przerwa optyczna Optical gap [eV]	Współczynnik załamania Refractive index n
20	2.78	1.71
50	3.13	1.98
100	3.14	2.07
300	3.31	2.24

TABELA 1
TABLE 1

Absorpcaja w podczerwieni

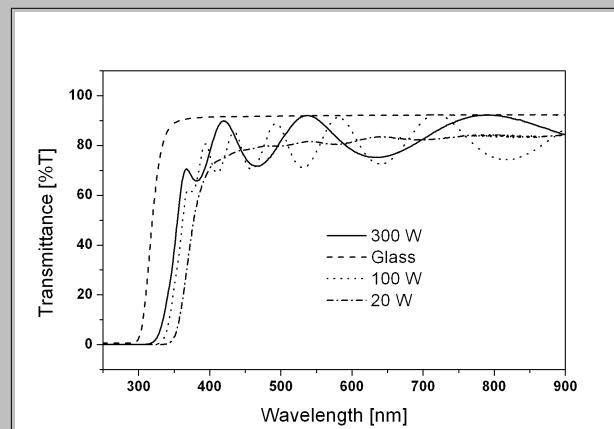
Wpływ mocy wyładowania na jakość warstw jest także widoczna w widmie absorpcyjnym przedstawionym na RYS.2. Uzyskane widmo absorpcyjne dla próbki nakładanej przy mocy 50 Wat wykazuje znaczne pasmo absorpcji przy liczbie falowej równej 3290cm^{-1} . Jest to związane z absorpcją promieniowania przez grupy -OH pochodzące z zaadsorbowanej wody. Absorpcaja tych grup jest także widoczna przy 1630 cm^{-1} . Dla próbek nakładanych przy mocy 300 Wat jest widoczne tylko niewielkie pasmo przy 3432 cm^{-1} pochodzący od grup -OH. W tym przypadku przypuszcza się, że jest to spowodowane tworzeniem się połączeń Ti-OH.

Różnice w widmach istnieją również w zakresie od 1100 do 500 cm^{-1} , gdzie ma miejsce absorpcja promieniowania przez grupy Ti-O. Maksimum przy 785 cm^{-1} jest związany z absorpcją promieniowania przez grupę Ti=O, podczas gdy przy 500 cm^{-1} następuje absorpcja przez wiązanie Ti-O i w takiej konfiguracji atom Ti jest związany z czterema atomami tlenu (dwutlenek). W widmie widoczne jest także to, że absorpcja przez wiązanie przy 785 cm^{-1} jest znacznie silniejsze dla próbki nakładanej przy mocy 50 Wat niż przy 300 Wat. Świadczy to o tym, że warstwy otrzymane przy mocy 50 Wat zawierają tlenki, które nie są w pełni stochiometryczne. To jest jeszcze jeden dowód na to, że do otrzy-

Results and discussion

Optical data

Optical properties of the films deposited on glass were used as criteria for their quality. Therefore, the UV-VIS absorption spectra of films produced at different RF power were taken. The result is presented in FIG. 1. The received E_g values together with those of refractive index at 550 nm for four samples deposited at different RF power are presented in TABLE 1. From the presented results it is evident, that both optical gap and refractive index grow with an increasing RF power of deposition to attain values similar to those received by other authors [9, 10].

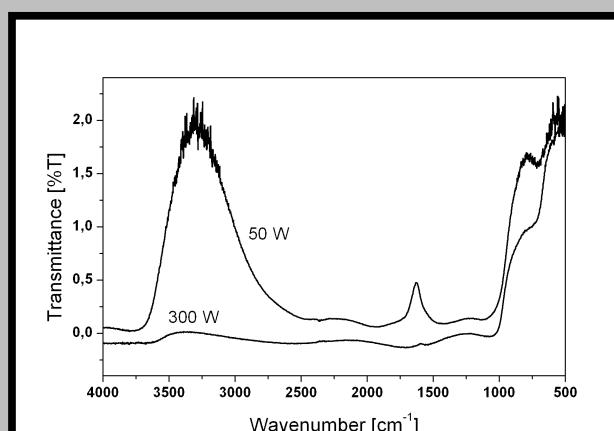


RYS. 1. Transmittancja warstw TiO_2 przy różnych mocach w.cz. nakładania.

FIG. 1. Transmittance of titanium oxide films produced at different RF power of deposition.

IR absorption

The influence of the discharge power on the quality of films is also visible in their infra-red absorption spectra, presented in FIG. 2. An absorption spectrum of the sample obtained at the power of 50 Watt shows a considerable strand of absorption at 3290 cm^{-1} . Is it connected with absorption of group -OH originating from the adsorbed water. Absorption of this groups is also visible at 1630 cm^{-1} . For samples deposited at power 300 Watt, there is only a very small strand originating from -OH groups at 3432 cm^{-1} . In



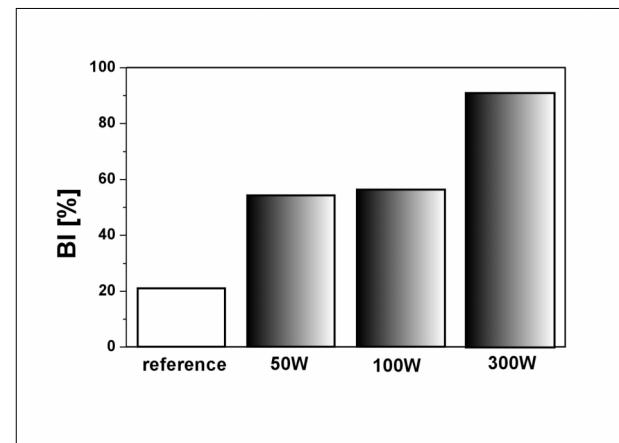
RYS. 2. Widma FTIR dla próbek nakładanych przy mocach 50 Wat i 300 Wat.

FIG. 2. FTIR spectra of the samples at the power of 50 Watt and 300 Watt.

mania warstw o dobrej jakości konieczne jest dobranie odpowiedniej wartości mocy wyładowania.

Inhibicja bakteryjna

Na RYS. 3 przedstawiono procentowy efekt bakteriobójczy dla serii płytEK szklanych pokrytych warstwą TiO_2 przy różnych mocach wyładowania. Z rysunku tego wynika, że naświetlanie komórek bakterii na płytEKach nie pokrytych wywołuje śmierć 21% ich populacji. Jeżeli naświetlamy w tych samych warunkach próbki pokryte warstwą toauważalny jest wzrost liczby martwych komórek dla próbek nakładanych przy większych mocach. Naświetlanie próbki pokrytej warstwą przy mocy 300 Watt prowadzi do zniszczenia ponad 90% komórek bakteryjnych.



RYS. 3. Efekt bakteriobójczy warstw TiO_2 nakładanych na szkłach przy różnych mocach wyładowania.

FIG. 3. Bactericidal effect of TiO_2 films deposited on glass at different RF power input.

Godne uwagi jest występowanie zależności pomiędzy jakością optyczną warstw, a ich biologiczną aktywnością. Procentowa zależność bakteryjnej inhibicji oraz współczynnika załamania światła zmierzonego przy długości fali 550nm, została przedstawiona na RYS.4. Wynika z tego, że im warstwa posiada większy współczynnik załamania światła tym wykazuje ona większy efekt bakteriobójczy.

Wnioski

Wyniki przedstawione powyżej dowodzą, że możliwe jest wytworzenie warstw TiO_2 posiadających właściwości bakteriobójcze, wykorzystując do tego celu metodę PECVD i stosując jako związek wyjściowy $TiCl_4$. Jakość tych warstw silnie zależy od mocy wyładowania. Najlepsze wyniki z badań optycznych (n i E_g) i strukturalnych zostały otrzymane dla mocy władowania równego 300 Watt. Przedstawione wyniki dowodzą, że warstwy TiO_2 wytworzone metodą PECVD wykazują wysoki stopień właściwości fotokatalitycznych, ujawniających się wzmożoną aktywnością bakteriobójczą. Efekt bakteriobójczy warstw wzrasta wraz ze wzrostem współczynnika załamania światła.

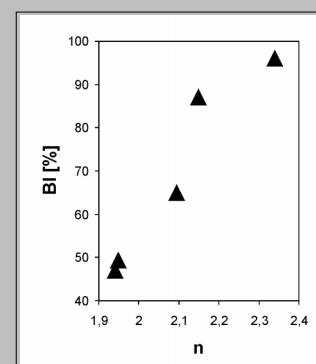
this case we attend, that it is due to the formation Ti-OH.

The differences between both spectra also exist in the 1100 - 500 cm^{-1} range, where the absorption of Ti-O group is active. The band at 785 cm^{-1} is connected with the absorption of Ti=O group (suboxide), while that at 550 cm^{-1} is connected with the absorption of Ti-O bonds in such a configuration where every Ti atom is connected with four atoms of oxygen (dioxide). As apparent from the presented spectra, the band at 785 cm^{-1} is considerably stronger for the sample deposited at the power of 50 Watt than for the sample obtained at 300 Watt. It means that layer received at 50 Watt contains oxides which are not fully stoichiometric. This is yet another proof of the fact, that in order to receive a layer of good qualities a considerable power of discharge is necessary.

Bacterial inhibition

FIG. 3 presents the percentage of bacterial inhibition BI for a series of titanium oxide coatings deposited on glass at different RF power input. It is seen from the figure that the UV irradiation of bacteria deposited on uncoated glass causes a death of 21% of their population. When irradiated under the same conditions, titanium oxide coated surfaces produce much higher bacteria death rate, increasing with the deposition power. The irradiation of the 300 Watt specimen kills more than 90% of all the bacteria.

It is interesting to note that there exists a correlation between the optical quality of the films and their biological activity. A dependence of the percentage of bacterial inhibition of the film on its refractive index at 550 nm is presented in FIG. 4. If the layer has higher refractive index load to increasing bactericidal effect.



RYS. 4. Zależność pomiędzy efektem bakteriobójczym warstw TiO_2 , a wartościami ich współczynnika załamania światła przy długości fali 550 nm.

FIG. 4. A correlation between bactericidal effect of titanium oxide films with the value of their refractive index at 550 nm.

Conclusion

The results presented above show, that it is possible to deposit layers of titanium dioxide using the PECVD method and $TiCl_4$ as a precursor. The quality of the layers depends strongly on the power of discharge. The best results for optical (n and E_g) and structural investigation, we obtained for 300 Watt power of deposition. The results presented show that a PECVD produced titanium oxide coatings to a large degree exhibit photocatalytic properties, revealed by a substantially enhanced bactericidal activity. The bactericidal effect of the coatings increases with increasing refractive index.

- [1] O.J. Jung, S.H. Kim, K.H. Cheong, W. Li, S.J. Saha: Bull. Korean Chem. Soc., 24, (2003), 49.
[2] P. Amézaga-Madrid, G.U. Nevárez-Moorillon, E. Orrantia-Borunda, M. Miki - Yoshida: FEMS Microbiol. Lett., 211, (2002), 183.
[3] J.A. Ibáñez, M.J. Litter, R.A. Pizarro: J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 15, (2003), 81.
[4] M.M. Kosanović: J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 119, (1998), 119.
[5] A. Fujishima, T.N Rao, D.A. Tryk: Electrochim. Acta, 45, (2000), 4683.

••••• References

- [6] C.C. Trapalis, P. Keivanidis, G. Kordas, M. Zaharescu, M. Crișan, A. Szatványi, M. Gartner: Thin Solid Films, 433, (2003), 186.
[7] M. Xu, N. Huang, Z. Xiao, Z. Lu: Supramol. Sci., 5,(1998), 449.
[8] M. Xu, J. Ma, J. Gu, Z. Lu: Supramol. Sci, 5,(1998), 511.
[9] H. Selhofor: Vacuum and thin films, August (1999) 15.
[10] L. Martinu, M. Latréche, W. Hajek, J. E. Sapieha, A. Argoitia, W.T. Beauchamp: SVC 43 rd Annual Technical Conference Proceedings, Denver, April 15-20, (2000), 177.

OBSERWACJE ZAMIAN MIKROSKOPOWYCH CEWNİKÓW TYPU DOUBLE-J W ZALEŻNOŚCI OD CZASU UTRZYMYWANIA ICH W DROGACH MOCZOWYCH

LESZEK KLIMEK*, WALDEMAR RÓŻAŃSKI**,
ZBIGNIEW JABŁONOWSKI**, MAREK SOSNOWSKI**, Rafał KLIŚ**

*POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

**KLINIKI UROLOGII I REHABILITACJI UROLOGICZNEJ INSTYTUTU
CHIRURGII UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁÓDZI,
UNIWERSYTECKI SZPITAL KLINICZNY NR 2,
UL. ŻEROMSKIEGO 113, 90-549 ŁÓDŹ, POLSKA

Streszczenie

W pracy oceniano stopień pokrywania i wypełniania kryształami i elementami organicznymi wnętrza cewników podwójnie zagiętych typu "Double-J" w zależności od czasu utrzymywania ich w górnym drógach moczowych.

Materiał: Ocenie makroskopowej i mikroskopowej poddano 27 cewników podwójnie zagiętych typu "Double-J". Czas utrzymywania cewnika w górnym drógach moczowych wynosił od 7 do 90 dni.

Metoda: Obserwację powierzchni i przekrojów cewników wykonano przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego Hitachi S 3000N.

Wyniki: Częściowe lub całkowite pokrycie cewnika składnikami organicznymi lub krystalicznymi moczu obserwowało na wszystkich cewnikach. Proces ten następował z różnym nasileniem w zależności od rodzaju cewnika, czasu utrzymywania w drógach moczowych oraz występowania zakażenia dróg moczowych.

Podsumowanie: Wydaje się, że w świetle przedstawionych obserwacji bardzo ważnym jest zachowanie pełnej jałowości dróg moczowych oraz nie przekraczanie określonych przez producenta czasów maksymalnego utrzymywania cewnika podwójnie zagiętego w drögach moczowych.

MICROSCOPIC INVESTIGATION OF DOUBLE-J CATHETERS DEPENDING ON THE LENGTH OF THEIR PRESENCE IN THE URINARY TRACT

LESZEK KLIMEK*, WALDEMAR RÓŻAŃSKI**,
ZBIGNIEW JABŁONOWSKI**, MAREK SOSNOWSKI**, Rafał KLIŚ**

*TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ INSTITUTE OF MATERIALS
ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

**DEPARTMENT OF UROLOGY AND UROLOGICAL REHABILITATION,
INSTITUTE OF SUGERY, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, UNIVERSITY
CLINICAL HOSPITAL NO. 2,
ŻEROMSKIEGO 113, 90-549 ŁÓDŹ, POLAND

Summary

Aim: The study assesses the degree to which urinary crystals and organic urinary components adhere to Double-J catheters depending on the length of their maintenance in the upper urinary tract.

Materials: 27 Double-J catheters were subjected to macroscopic and microscopic evaluation. The time of their presence in the urinary tract ranged from 7 to 90 days.

Method: The observation of the surface and section of the catheters was carried out using a scanning electron microscope Hitachi S 3000N..

Results: Each of the evaluated catheters was partially or completely covered by organic or mineral urinary components. The speed of the process depended on the type of the catheter, the length of its presence in the urinary tract and the incidence of urinary infection. Conclusion: It seems that in light of the illustrated observations, it is essential to maintain complete sterility of the urinary tract and not to exceed the maximum time of keeping a Double-J catheter inside a patient's urinary tract set by the manufacturer.

Key words: Urinary tract, Double-J catheter, crystals and non-crystal urinary components.

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 36-39]

Słowa kluczowe: Drogi moczowe, cewnik podwójnie zagięty, kryształy i składniki niekristaliczne moczu.

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 36-39]

Wprowadzenie

Cewniki podwójnie zagięte skutecznie zabezpieczają odpływ moczu z górnych dróg moczowych i od lat sześćdziesiątych są ważnym narzędziem w rękach urologów [1, 2]. Pierwszy opisał zastosowanie tego typu cewnika w 1967 roku Zinskind i wsp. [3]. W latach siedemdziesiątych wprowadzono nowoczesne biomateriały do produkcji cewników podwójnie zagiętych, dzięki czemu ten typ cewnika stał się powszechnie stosowanym urządzeniem w urologii. Od wielu lat jest powszechnie zalecanym sposobem leczenia przeszkoły w nieoperacyjnych guzach utrudniających odpływ moczu z górnych dróg moczowych, oraz jako leczenie uzupełniające podczas kruszenia kamieni zlokalizowanych w układzie kielichowo-miedniczkowym lub w moczowodzie na drodze ESWL, PCNL, URSL [4]. Powszechnie stosowane są w zabiegach rekonstrukcyjnych moczowodów. Wskazaniem do założenia cewnika do moczowodu są jego nabycie zwężenia: w wyniku rozległych zabiegów (urologicznych, chirurgicznych, ginekologicznych, ortopedycznych, stosowanie energii promienistej w obrębie miednicy). Można stosować go również w zabiegach rekonstrukcyjnych moczowodu. Cewnik podwójnie zagięty zakładamy wówczas gdy mamy do czynienia z blizną zaciskającą moczowod lub ze zwłóknieniem tkanki pozaotrzewnowej oraz we wszelkiego rodzaju przeszkołach połączeń miedniczkowo-moczowodowych lub moczowodowo-pęcherzowych. Stosowanie cewników podwójnie zagiętych obarczone jest pewnymi komplikacjami takimi jak: zarastanie światła cewnika przez elementy organiczne i krystaliczne obecne w moczu, oraz możliwością rozwoju zakażenia w drogach moczowych. Powikłania te wymagają wcześniego usunięcia, lub regularnej wymiany co kilka tygodni założonego wcześniej do moczowodu cewnika. Czas utrzymywania cewnika w drogach moczowych zależy od rodzaju choroby z powodu, której został wprowadzony do dróg moczowych. Ważnym czynnikiem wpływającym na czas utrzymywania cewnika w drogach moczowych jest rodzaj materiału z jakiego został zbudowany, lub jakim został pokryty cewnik. Do najczęściej stosowanych, cewników należą: cewniki poliuretanowe, silikonowe, cewniki pokrywane hydrożelem oraz cewniki lateksowe [5].

Do dróg moczowych zakładamy różne rodzaje cewników w zależności od przyczyny i czasu jaki będzie stent pozostawał w organizmie. Obserwujemy wówczas reakcję organizmu na cewnik. W zależności od czasu utrzymywania cewnika w drogach moczowych następuje uszkodzenie nabłonka urotelialnego w miejscach największego narażenia na mechaniczne drażnienie przez cewnik. Długotrwałe utrzymywanie cewnika powoduje przerost nabłonka urotelialnego, a wraz z upływem czasu nadmierne jego złuszczanie i wydzielenie znacznych ilości śluzu. Proces ten w krótkim czasie powoduje zarastanie otworów bocznych cewnika a w ostateczności kanału centralnego cewnika [6].

Przy zachowaniu pełnej drożności cewnika przy wzroście ciśnienia w pęcherzu spotykamy się ze zjawiskiem odpływu wstecznego moczu do nerki. Fakt ten może być przyczyną szerzenia się zakażenia dróg moczowych drogą wstępującą. Przy bardzo gwałtownym narastaniu zakażenia układu moczowego konieczne jest stosowanie antybiotyków zgodne z wynikami posiewu moczu, a w ostateczności usunięcie cewnika podwójnie zagiętego i zastąpienie go innym sposobem odprowadzenia moczu (założenie prze-

Introduction

Double-J catheters are an effective way of protecting the outflow of urine from the upper urinary tract and since the 1960s have been an important tool in the hands of urologists [1, 2]. The first one to describe the use of this type of catheter was Zinskind et al. in 1967 [3]. In the 1970s modern biomaterials were used in the production of double-J catheters, allowing this type of catheter to become a popular tool in urology. For many years it has been a widely recommended way of treating obstructions in inoperable tumours blocking the outflow of urine from the upper urinary tract and as a supplementary treatment in crushing urinary stones located in the renal calyx or in ureter by ways of ESWL, PCNL or URSL [4]. They are widely used in reconstruction treatment of ureters. Insertion of a catheter is recommended in cases of acquired ureteral strictures caused by extensive treatment (urological, surgical, gynecological, orthopedic, usage of radiant energy in the vicinity of the pelvis). It can also be used in reconstruction treatment of ureters. A double-J catheter is inserted when dealing with a contracting scar of the ureter or fibrosis of extraperitoneal tissue and all sorts of obstructions blocking the renal-ureter or ureter-bladder junctions. The usage of double-J catheters is laden with certain complications, such as blocking the lumen of the catheter by organic and mineral components or the possibility of the development of an infection in the urinary tract. These complications require an early removal or regular replacement of the inserted catheter. The length of keeping a catheter in the urinary tract depends on the type of illness which caused the insertion. An important factor influencing the length of insertion is the type of material used to construct or coat the catheter. Among the most widely used catheters are polyurethane, silicon, hydrogel-coated and latex catheters [5].

Different types of catheters are used depending on the cause and the length of the period during which the stent will remain in the system. The system reacts to the catheters in different ways. Depending on the period of its presence in the urinary tract, the catheter can cause damage to the urothelial epithelium through mechanical irritation. A lengthy presence of the catheter causes hypertrophy of the urothelium and with time excessive exfoliation and secretion of large amounts of mucus. This process shortly causes the encrustation of the side lumens and, finally, the main lumen of the catheter [6].

When maintaining full patency of the catheter, we can observe the phenomenon of urinary reflux into the kidney when the pressure in the bladder is high. This can be the cause of a rapid spread of ascending urinary infection. In cases of a very rapid spread of a urinary infection, it is necessary to administer antibiotics according to the results of urine culture, and in extreme cases to remove the double-J catheter and replace it with another way of urinary diversion (renal-dermal fistula). The problem of urinary tract infection taking place during the presence of a double-J catheter in its lumen is especially difficult in cases of infection by urease-positive bacteria. In such cases, the catheter quickly becomes colonized by microorganisms and encrusted by minerals [7,8]. Another problem that can be encountered is the limitation of peristaltic movement of the ureteral wall caused by the presence of the catheter in its lumen. This problem is especially important when voiding crushed remains of calculi from the kidney or ureter after such procedures as ESWL, PNCL or URSL. The presence of a catheter in the renal pelvis and ureter may cause attenuation of renal perfusion and reduce the production of urine [6].

toki skórno-nerkowej). Problem zakażenia dróg moczowych podczas obecności w nich świdla cewnika podwójnie zagiętego jest szczególnie trudny w przypadku zakażenia bakteriami ureazododatnimi. W takiej sytuacji następuje bardzo szybka kolonizacja cewnika przez drobnoustroje oraz stopniowe pokrywanie cewnika i wypełnianie jego kanału centralnego kamieniami [7, 8]. Innym problemem, z jakim możemy się spotkać to ograniczenie perystaltyki ściany moczowodu spowodowane obecnością cewnika w jego świdlu. Problem ten nabiera znaczenia w przypadkach wydalania pokruszonych fragmentów kamieni z nerki lub moczowodu po takich zabiegach jak ESWL, PCNL czy URSL. Obecność cewnika w miedniczce i moczowodzie może powodować osłabienie ukrwienia nerki i zmniejszenie produkcji moczu [6].

Cel pracy

Celem pracy była ocena szybkości i częstości zarastania kanału centralnego i otworów bocznych cewnika podwójnie zagiętego elementami organicznymi lub krystalicznym w zależności od rodzaju choroby i czasu utrzymywania ich w drogach moczowych.

Materiał i metoda

Ocenie makroskopowej i mikroskopowej poddano 27 cewników podwójnie zagiętych po ich usunięciu z górnych dróg moczowych. Dwadzieścia pięć cewników było zbudowanych z poliuretanu, a dwa były cewnikami silikonowymi. Czas utrzymywania cewnika w drogach moczowych wynosił od 7 do 90 dni. W 23 przypadkach cewnik założono u chorych leczonych z powodu kamicy dróg moczowych. W 2 przypadkach założono cewnik u chorych leczonych z powodu nowotworu dróg moczowych. Dwa razy zakładano cewnik podwójnie zagięty do moczowodu uszkodzonego podczas zabiegu usuwania guza jelita podczas zabiegu chirurgicznego.

Obserwację powierzchni i przekrejów cewników wykonano przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego Hitachi S 3000N, firmy Hitachi. W celu poprawienia jakości obserwowanych obrazów cewniki napełniono warstwą złota Au-4N (99,99% Au). Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy napięciu przyspieszającym mikroskopu - 15kV. Stosowany zakres powiększeń obserwacji wynosił od 30 do 200 razy.

Wyniki

Na RYS. 1-6 przedstawiono mikroskopowe obrazy badanych cewników.

Własne doświadczenia

Analizując przypadki założenia cewników podwójnie zagiętych w Klinice Urologii i Rehabilitacji Urologicznej w Łodzi spotkaliśmy się ze wszystkimi wyżej opisanymi trudnościami i powikłaniami. W przypadku chorych z nowotworami powodującymi naciek z zewnątrz na ścianę moczowodu i zwężenie jego światła, stosując cewniki silikonowe utrzymywane do 3 miesięcy spotykaliśmy na ich powierzchni odkładające się drobne kryształy (RYS. 1). Jednak takie obrazy uzyskiwano tylko w przypadku zachowania pełnej jałowości dróg moczowych. W przypadku wystąpienia zakażenia dróg moczowych i jednocięsnego utrzymywania cewnika w ich świdlu, na cewniku pojawiały się twory włókniste powodujące stopniowe zarastanie otworów bocznych cewnika (RYS. 2), a następnie kanału centralnego cewnika. Dodatkowym elementem wpływającym na zarastanie

Aim of the study

The aim of the study was to evaluate the speed and frequency of encrustation of the main and side lumens of a double-J catheter by organic or mineral components depending on the type of illness and period of the catheter's presence inside the urinary tract.

Materials and methods

Macroscopic and microscopic observation was applied to 27 catheters after they were removed from the patients' upper urinary tracts. 25 catheters were made of polyurethane and 2 were made of silicon. The catheters were kept in place for 7 to 90 days. In 23 cases the catheter was inserted due to ureterolithiasis. In 2 cases the cause was urinary tract neoplasm. Twice the catheter was inserted into a urinary tract that was damaged during a surgery to remove a tumour from the colon.

The surfaces and cross-section of the catheters was observed using a scanning electron microscope Hitachi S 3000N. To enhance the quality of the examined images, the catheters were sputtered with a layer of gold Au-4N (99,99% Au). The observations were carried out using an accelerating voltage of 15 kV. The magnification scope used was 30x to 200x.

Results

Images of the surface examined a double-J catheter are presented in FIGs.1-6.

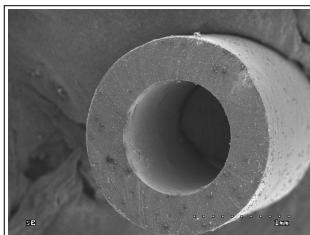
Experiences

When analyzing the double-J catheters in the Department of Urology and Urological Rehabilitation in Łódź, we encountered all the problems and complications described above. When using silicon catheters kept in place for up to 3 months in cases of patients with neoplasms causing external infiltration of the ureteral wall and encrustation of its lumen, we observed small crystals adhering to the surfaces of the catheters (FIG. 1). However, such images were received only when full sterility of the urinary tract was maintained. In cases where catheters were inserted into the lumens of infected urinary tracts, fibrous growth appeared on the catheters, causing gradual encrustation of the side lumens of the catheter (FIG. 2) and, finally, of its main lumen. Additional factors affecting the encrustation of the catheter lumens are excessive secretion of mucus and exfoliation of epithelium, which together cause homogenous masses to appear and block the catheter completely (FIG. 3).

When catheters were inserted in the urinary tract lumens for the purpose of facilitating the expelling of crushed urinary calculi, we observed crystals ad here to the surface of the catheter relatively early (FIG. 4). When the catheter was kept in the urinary tract for 4 to 6 weeks, it could be observed that the catheter became coated not only by crystals, but also by fibrous growth, which caused partial (FIG. 5) and ultimately complete encrustation of the catheter lumen. In extreme cases, an almost complete encrustation of the catheter by a mineral film or formation of calculus on its surface took place (FIG. 6). Thus created calculus prevents unhampered removal of the catheter from the ureter and forces a surgical intervention to remove the catheter from the urinary tract.

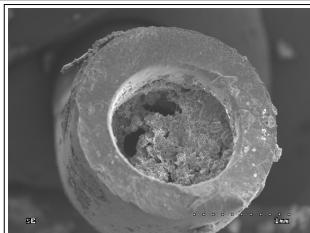
Summary

It appears that in light of the presented observations, it is essential to maintain full sterility of the urinary tract and avoid



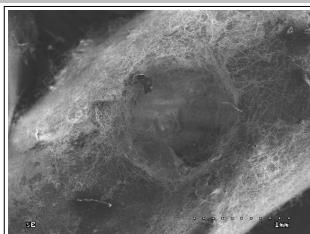
RYS. 1. Powierzchnia cewnika silikonowego po trzech miesiącach utrzymywania w moczowodzie.

FIG. 1. Surface of a silicon catheter after being kept in the ureter for 3 months.



RYS. 3. Bezpostaciowe masy organiczne wypełniające światło cewnika podwójnie zagiętego.

FIG. 3. Amorphous organic masses encrusting the lumens of a double-J catheter.



RYS. 5. Pokrywanie powierzchni cewnika podwójnie zagiętego tworami włóknistymi i zarastanie kanału centralnego.

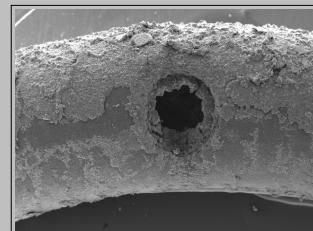
FIG. 5. Surface of a double-J catheter coated by fibrous growth and encrustation of the main lumen.

światła kanału cewnika i jego otworów bocznych jest nadmiar śluzu produkowanego przez drogi moczowe drażniące przez cewnik oraz złuszczające się nabłonki, co razem tworzy jednolite masy powodujące całkowitą niedrożność cewnika (RYS. 3).

W przypadku cewników założonych do dróg moczowych w celu ułatwienia wydalania pokruszonych kamienia z ich światła obserwujemy stosunkowo wcześnie odkładanie się kryształów na powierzchni cewnika (RYS. 4). W przypadku utrzymywania cewnika od 4 do 6 tygodni widoczne jest stopniowe pokrywanie cewnika nie tylko kryształami, ale i tworami włóknistymi powodujące częściowe (RYS. 5), a w ostateczności całkowite zamknięcie jego światła. W skrajnych przypadkach obserwujemy pokrycie prawie całego cewnika otoczką kamienną lub formowanie się kamienia na jego powierzchni (RYS. 6). Powstający w taki sposób kamień uniemożliwia swobodne usunięcie cewnika z moczowodu i zmusza do wykonania zabiegu operacyjnego w celu pozbicia się cewnika z dróg moczowych.

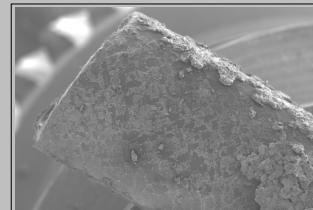
Podsumowanie

Wydaje się, że w świetle przedstawionych obserwacji bardzo ważnym jest zachowanie pełnej jałowości dróg moczowych oraz nie przekraczanie określonych przez producenta czasów maksymalnego utrzymywania cewnika podwójnie zagiętego w drogach moczowych. Z przedstawionych badań wynika, że stosowane materiały nie zabezpieczają przed osadzaniem się na powierzchni cewników kamienia moczowego.



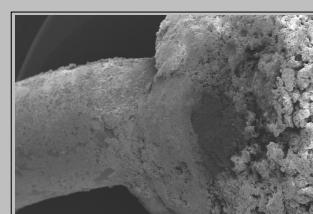
RYS. 2. Powierzchnia cewnika podwójnie zagiętego utrzymywanego w zakażonych drogach moczowych.

FIG. 2. Surface of a double-J catheter kept in an infected urinary tract.



RYS. 4. Stopniowe pokrywanie powierzchni cewnika przez płytki kryształów.

FIG. 4. Gradual coating of the surface of a catheter by crystalline plaque.



RYS. 6. Całkowite pokrycie powierzchni cewnika podwójnie zagiętego kamieniem.

FIG. 6. Surface of a double-J catheter completely coated by calculus.

exceeding the maximum time of keeping a double-J catheter inside the urinary tract set by its manufacturer. From the presented results it appears that applied materials do not protect the surface of the catheter against the sedimentation of urinary stones.

Piśmiennictwo

References

- [1] Vallejo H.J., Burgos R.F.J., Maganto P. E, Martinez-Fornes T. M., de la Muelay S. Naverac P., Martin-Laborday B.F.: The double-J catheter. Clinical indications., Arch. Esp. Urol., 50, (1997),1089-1097,
- [2] Vallejo H.J., Maganto P.E., Burgos R.F.J., de la Muelay S., Naverac P., Martin-Laborday B.F.: The double-J ureteral catheter: its historical development and current status., Arch. Esp. Urol., 52,(1992), 499-504,
- [3] Zimskind P.D, Fetter T.R, Wilkerson J.L. : Clinical use of long-term indwelling silicone rubber ureteral splints inserted cystoscopically., J. Urol., 97,(1967), 840-846,
- [4] Lesiewicz H., Miękoś E., Różański W., Pawlak Cz., Pisarski M., Majek A., Zydek C.: Dodatkowe zabiegi w leczeniu kamicy moczowej na drodze ESWL., Urologia Polska, 45, (1992), 254-259.
- [5] Desgrandchamps F, Moulinier F, Daudon M, Teillac P, Le Duc A.: An in vitro comparison of urease-induced encrustation of JJ stents in human urine., Brit. J. Urol., 79, (1997), 24-27.
- [6] Docimo S.G., Dewolf W.C.: High failure rate of indwelling ureteral stents in patients with extrinsic obstruction: experience at 2 institutions., J. Urol., 142, (1989), 277-279.
- [7] Morris N.S, Stickler D.J.: Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine., J. Hosp. Infect., 39, (1998), 227-234.
- [8] Farsi H.M, Mosli H.A, Al-Zemaity M.F, Bahnassy A.A, Alvarez M.: Bacteruria and colonization of double-pigtail ureteral stents: long-term experience with 237 patients., J. Endourol., 9, (1995),469-472.

40. BUDOWA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA WARSTW AZOTKU I WĘGLIKO-AZOTKÓW TYTANU NA STOMATOLOGICZNYM STOPIE WIRONIT

LESZEK KLIMEK

POLITECHNIKA ŁÓDZKA INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. STEFANOWSKIEGO 1, 90-924 ŁÓDŹ

Streszczenie

Szeroko stosowane w protetyce stomatologicznej stopy metali oprócz niewystarczającej odporności korozyjnej mogą powodować u niektórych pacjentów alergię, której źródłem są produkty korozji oraz jony metali wchodzących w skład stopów. W celu poprawienia ich właściwości pokrywa się je różnego rodzaju warstwami. Najczęściej stosowane są azotki metali, a w szczególności azotki tytanu. Jednak odporność korozyjna tak otrzymanych warstw nie jest zadowalająca. W niniejszej pracy przedstawiono wstępne wyniki badań nad przydatnością warstw węglkoazotków tytanu na stopie stomatologicznym WIRONIT. Określono skład chemiczny oraz fazowy uzyskanych warstw, morfologię ich powierzchni a także przeprowadzono badania odporności korozyjnej metodą potencjodynamiczną.

Słowa kluczowe: azotki, węglkoazotki, stopy stomatologiczne,
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 40-43]

Wstęp

Stopy metali są materiałami szeroko stosowanymi w protetyce stomatologicznej m.in. ze względu na trwałość i korzystne właściwości mechaniczne. Przy czym stosuje się zarówno stopy metali szlachetnych (zawierające w przeważającej ilości takie pierwiastki jak złoto, platyna, pallad) oraz stopy nieszlachetne, których głównymi składnikami są: żelazo, kobalt, nikiel tytan [1]. Skutkami ubocznymi stosowania stopów metali, szczególnie nieszlachetnych, mogą być reakcje organizmu w postaci np. alergii. Ich źródłem mogą być produkty korozji a także uwalniane w procesie korozji jony metali, które przenikają do otaczających tkanek. Pomimo tego są one nadal stosowane w protetyce, ponieważ w chwili obecnej brak jest alternatywnych materiałów, które miałyby porównywalne z nimi właściwości i mogły konkurować z nimi pod względem ekonomicznym. Jednak dzięki różnorodnym modyfikacjom powierzchni możliwe jest poprawienie tolerancji biologicznej tych stopów. Spośród wielu dostępnych metod często stosowane jest pokrywanie powierzchni tych stopów warstwami osadzanymi z fazy gazowej [2, 3]. Z wielu otrzymywanych tymi metodami powłok najczęściej zastosowanie znajdują azotki metali, a szczególnie azotki tytanu. Wynika to głównie z ich dużej trwałości i odporności na korozję [4, 5, 6]. Wstępne badania [7, 8] wykazały, że odporność tą można jeszcze poprawić modyfikując te warstwy tak, aby uzyskać wę-

STRUCTURE AND CORROSION RESISTANCE OF THE TITANIUM NITRIDES AND NITROCARBIDES LAYERS ON THE WIRONIT DENTAL ALLOY

LESZEK KLIMEK

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, INSTITUTE OF MATERIALS ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND

Abstract

Metal alloys widely used in the dental prosthetics, despite their insufficient corrosion resistance may cause allergy in case of some patients, the sources of which are mainly products of corrosion as well as ions of metals forming an alloy. In order to improve their properties they are usually covered with various kinds of layers. Metal nitrides, particularly titanium nitrides, are used most often. Although, the corrosion resistance of the layers obtained this way is unsatisfactory. In this paper, the initial results of the examination of the usefulness of the titanium nitrocarbide layers on the WIRONIT dental alloy have been presented. The chemical composition, phase diagram and surface morphology have been determined. The examinations of corrosion resistance by the potentiodynamic method have been conducted.

Keywords: nitrides, nitrocarbides, dental alloys
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 40-43]

Introduction

Metal alloys are the materials widely used in dental prosthetics, mainly because of their durability and beneficial mechanical properties. The alloys of both noble metals (containing mainly such elements as gold, platinum, palladium) and base ones, composed in the main part of iron, cobalt, nickel and titanium are utilised [1]. Using metal alloys, especially base ones, can cause different side effects, such as a variety of organism reactions, e.g. allergy. Sources of these effects can be products of corrosion as well as the metal ions released in the process of corrosion that infiltrate the surrounding tissues. In spite of this they are still used in the prosthetics, due to lack of the alternative materials having comparable properties and equally economical. However thanks to different modifications it is possible to improve the biological tolerance of these alloys. Among many methods available which cover the surface with layers deposited from the gaseous phase are commonly used. [2, 3]. From many types of layers obtained this way, the most often applied are metal, particularly titanium, nitrides. This results mostly from their high durability and corrosion resistance [4, 5, 6]. Initial examinations [7, 8] showed that this durability can still be improved by modifying the layers in order to obtain titanium nitrocarbides.

glikoazotki tytanu.

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie składu chemicznego, fazowego oraz morfologii warstw azotku i węglikoazotków tytanu na stopie WIRONIT oraz porównanie ich odporności korozyjnej w środowisku sztucznej śliny. Stop ten jest w stomatologii wykorzystywany do odlewów szkieletów protez ruchomych, więc poprawienie jego odporności korozyjnej ma istotne znaczenie.

Materiał i metodyka badań

Materiał do badań stanowiły wykonane ze stopu WIRO-NIT krążki o średnicy 12 mm i wysokości 10 mm. Skład chemiczny stopu określony metodą rentgenowskiej analizy fluorescencyjnej na spektrometrze rentgenowskim SIE-MENS SRS 300 podano w TABELI 1.

Zawartość pierwiastków [%] wag. Contents of the elements – mass [%].							
C	Cr	Mo	Fe	Mn	Si	Ni	Co
0,32	28,36	4,81	1,07	0,85	0,43	0,09	reszta

TABELA 1. Skład chemiczny stopu użytego do badań.

TABLE 1. Chemical composition of the alloy used to researches.

20 próbek wykonanych z tego stopu podzielono na 4 grupy po 5 próbek. Jedna grupa pozostała bez pokrycia i stanowiła grupę kontrolną, natomiast z pozostałych jedna została pokryta warstwą azotku tytanu - TiN, natomiast dwie pozostałe warstwami węglikoazotku tytanu TiCN, przy czym poszczególne grupy różniły się zawartością węgla i azotu w warstwie. Na tak otrzymanych powłokach wykonano obserwacje powierzchni w elektronowym mikroskopie skaninowym HITACHI S-3000N oraz badanie ich składu chemicznego metodą mikroanalizy chemicznej. Badania te prowadzono na przystawce do mikroanalizy firmy NORAN współpracującej z elektronowym mikroskopem skaningowym. Wykonano zarówno analizę jakościową jak i ilościową. W celu określenia składu fazowego otrzymanych warstw wykonano badania dyfrakcyjne rentgenowską na dyfraktometrze rentgenowskim SIEMENS D-500. Następnie próbki poddano badaniu korozyjnemu metodą potencjodynamiczną. Badania te wykonano wykorzystując zestaw ATLAS 99.

Wyniki

Na RYS. 1 przedstawiono wygląd powierzchni oraz spektrogramy uzyskane z warstw badanych próbek.

Wyniki analizy ilościowej składu chemicznego naniesionych warstw zamieszczono w TABELI 2.

Krzywe potencjodynamiczne otrzymane w badaniach korozyjnych zamieszczono na RYS. 2.

Omówienie wyników badań

Wyniki przeprowadzonej mikroanalizy chemicznej pokazują duże zróżnicowanie składu chemicznego badanych warstw. Na przedstawionych na RYS. 1b, c spektrogramach widać wyraźne zróżnicowanie wysokości pików pochodzących od azotu i węgla, co świadczy o różnej zawartości tych

Aim of the work

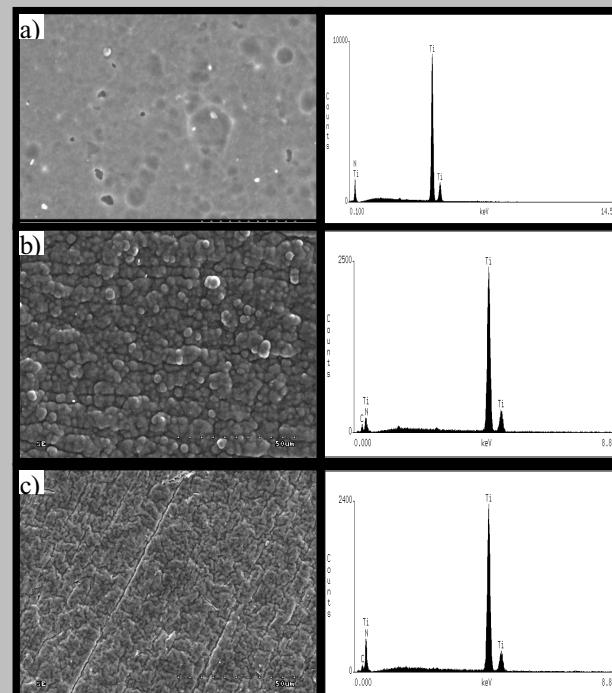
The aim of this study was to examine the chemical and phase composition as well as the morphology of the titanium nitride and nitrocarbides coatings on the WIRONIT alloy. The comparison of their corrosion resistance in the artificial saliva environment was also assumed. The alloy is utilised in dentistry for casting movable frames, so its improvement is very significant.

Substrates and methodology

The discs of the 12 mm diameter and 10 mm height made of the WIRONIT alloy were used as a material to the researches. The chemical composition, determined applying the method of fluorescent X-Ray analysis conducted on X-Ray Spectrometer SIEMENS SRS 300 is presented in TABLE 1.

20 specimens made of this alloy were divided into 4 groups of 5 specimens. First group remained without coating and made a control group. Second group was covered with the titanium nitride (TiN) layer. The samples from the remaining two groups were covered with titanium nitrocarbide (TiCN), but the contents of carbon and nitrogen in the layers were different for the two groups.

On the coatings obtained this way the surface observations in the scanning electron microscope HITACHI S-3000 were carried out. The examination of the chemical composition by chemical microanalysis method was done applying NORAN EDS microanalysis that cooperates with the scanning electron microscope. Both qualitative and quantitative analysis were conducted. In order to determine the phase content of the obtained layers, diffraction researches

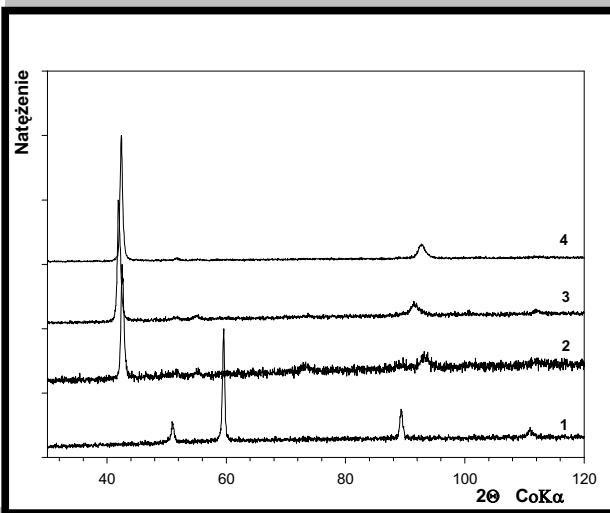


RYS. 1. Morfologia powierzchni i spektrogramy EDS warstw azotków węglikoazotków tytanu naniesionych na podłoże ze stopu WIRONIT: a) warstwa TiN, b) warstwa TiCN1, c) warstwa TiCN2.
FIG. 1. Surface morphology and EDS spectrograms of the titanium nitrocarbides covering the WIRONIT alloy: a) TiN layer, b) TiCN1 layer, c) TiCN2 layer.

Warstwa Layer	Zawartość pierwiastków Contents of elements					
	Ti		N		C	
	% wag. mass	% atom. atomic	% wag. mass	% atom. atomic	% wag. mass	% atom. atomic
Azotek Nitride	69,13	51,37	40,87	48,63	-	-
Węglikoazotek1 Nitrocarbide 1	83,49	58,47	12,37	29,72	4,14	11,61
Węglikoazotek2 Nitrocarbide 2	77,57	47,66	7,46	15,68	14,96	36,66

TABELA 2. Wyniki analizy chemicznej badanych warstw.

TABLE 2. Results of the chemical analysis of the investigated layers.



RYS. 2. Dyfraktogramy rentgenowskie otrzymane z badanych warstw: 1. stop WIRONIT bez warstwy, 2. stop WIRONIT z warstwą azotku TiN, 3. stop WIRONIT z warstwą węglikoazotku 1, 4. stop WIRONIT z warstwą węglikoazotku 2.

FIG. 2. Diffractograms obtained from the examined layers: 1. WIRONIT alloy without layer, 2. WIRONIT alloy with TiN layer, 3. WIRONIT alloy with TiCN1 layer, 4. WIRONIT alloy with TiCN2 layer.

pierwiastków w poszczególnych warstwach węglikoazotków. Wyniki przeprowadzonej ilościowej mikroanalizy składu chemicznego warstw wykazały, że w przypadku azotku tytanu TiN warstwa posiadała prawie stechiometryczny stosunek Ti/N - 51,37/48,63. Natomiast otrzymane warstwy węglikoazotków różniły się wyraźnie zawartością węgla i azotu. W przypadku warstwy oznaczonej TiCN1 było to 29,72% N i 11,61% C (atomowo), natomiast dla warstwy oznaczonej TiCN2 - 15,68% N i 36,66% C (atomowo). Brak pików pochodzących od pierwiastków podłoża, a więc głównie chromu i kobaltu świadczy o kilku mikrometrowej grubości badanych warstw. Metodą symulacji komputerowej [8] określono jej grubość na około 2 μm .

Obserwacje mikroskopowe pokazały, że powierzchnie tak otrzymanych warstw są stosunkowo rozwinięte. Wyraźnie widoczne są rysy bądź podłużne pęknięcia w warstwie (RYS. 1b). Z uwagi na ich obecność warstwy te mogą nie wykazywać dostatecznej szczelności. Powierzchnia próbki pokrytej warstwą węglikoazotku tytanu bogatszą w węgiel wydaje się być bardziej szczelną.

Na dyfraktogramie próbki bez warstwy obecne są piki pochodzące od podłoża ($2\theta \sim 51,13$ deg, 59,32 deg, 89,14

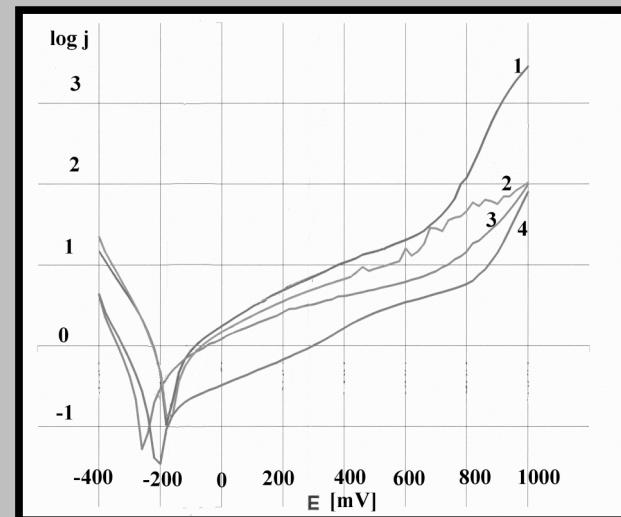
by the X-ray method were performed on the X-ray diffractometer SIEMENS D-500. Next, the specimens were exposed to the corrosion examination using potentiodynamic method. This part was carried out on the ATLAS 99 set.

Results

Images of the surface and spectrograms obtained from the layers of the examined samples are presented in FIG. 1.

The results of the quantitative analysis of the chemical composition of the layers are presented in TABLE 2.

Potentiodynamic curves obtained during corrosion examination are presented in FIG. 3.



RYS. 3. Krzywe potencjodynamiczne uzyskane na stopie WIRONIT: 1. bez warstwy, 2. z warstwą azotku TiN, 3. z warstwą węglikoazotku 1, 4. z warstwą węglikoazotku 2.

FIG. 3. Potentiodynamic curves obtained from the WIRONIT alloy: 1. without layer, 2. with layer TiN, 3. with layer TiCN1, 4. with layer TiCN2.

Comments on the results of examinations

The results of the chemical microanalysis showed high differentiation of the chemical composition of the examined layers. In the spectrograms 1b, c the differentiation of the peak heights in different layers of nitrocarbides is clearly visible. Results of the quantitative microanalysis demonstrated that in case of titanium nitride TiN, layer possessed almost stoichiometric ratio of Ti/N- 51.37/48.63. Layers of nitrocarbides differed apparently by the content of carbon and nitrogen. In case of the layer marked as TiCN1 it was: 29.72% N and 11.61% C (atomic), and for the layer marked as TiCN2 - 15.68% N and 36.66% C (atomic). Lack of peaks coming from the elements of the basis, so mainly from chromium and cobalt was an evidence the thickness of the examined layers did not exceed a few microns. The attempts of determining with computer simulations [8] gave the result of about 2 μm .

Microscopic observations showed that the surfaces of layers obtained this way are relatively developed and may not have sufficient tightness. Scratches or longitudinal cracks in the layer are clearly visible (FIG. 1b). The surface of the titanium nitride layer, richer with carbon seems to be more tight.

In the diffractogram of the sample without the layer, peaks coming from the basis ($2\theta \sim 51,13$ deg, 59,32 deg, 89,14 deg)

deg). Natomiast w próbkach z naniesionymi warstwami otrzymujemy praktycznie tylko refleksy od warstw, co świadczy o ich kilku mikrometrowej grubości. Im więcej węgla w warstwie tym bardziej uwidacznia się przesunięcie piku w stronę węglika tytanu. I tak w warstwie z azotkiem tytanu obserwujemy pik przy $2\theta \sim 42.83$ deg. Obecność 5,68 % at. C przesuwa pik do wartości $2\theta \sim 42.59$ deg, natomiast jeszcze większa zawartość węgla (11,10%at.C) do wartości $2\theta \sim 42.31$ deg.

Z analizy krzywych przedstawionych na RYS. 3 wynika, że powłoki azotku i węglikoazotku tytanu w niewielkim stopniu poprawiają odporność korozyjną stopu WIRONIT. Nie obserwuje się natomiast zasadniczych różnic w odporności korozyjnej warstw węglikoazotków i azotków na tych stopach. Na krzywych potencjodynamicznych wyraźnie widoczny jest obszar pasywny, w przypadku warstw pokrytych powłokami większy niż dla próbek bez pokrycia. Próbki pokryte warstwami węglikoazotków tytanu zachowują się podobnie do próbek pokrytych azotkiem tytanu, jeśli chodzi o rodzaj występującej korozji.

Mała poprawa odporności korozyjnej badanych warstw może też być spowodowana ich porowatością, która znacznie pogarsza szczelność powłok a tym samym ich odporność korozyjną.

Piśmiennictwo

- [1] Christens G.J., Craig R.G., Powers J.M., Wataha J.C.: Materiały stomatologiczne. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner Wrocław 2000.
- [2] Wendler B., Błaszczyk A., Chejchman Z., Gawroński Z., Jakubowski K.: "Wytwarzanie, właściwości i zastosowanie cienkich warstw węglików i węglikoazotków na podłożach stalowych" Nowoczesne Technologie w Inżynierii Powierzchni. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Łódź - Spała 20-23. 09. 1994 Kwadrat Łódź 1994. 255-260.
- [3] Wierzchoń T., Precht W., Ulbin-Pokorska I., Sikorski K.: "Struktura i odporność korozyjna warstw azotku chromu wytwarzanych na stali metodą próżniowego odparowania łukowego" II Ogólnopolska Konferencja Naukowa Nowe Technologie w Inżynierii Powierzchni. Inżynieria Materiałowa 2000. XXI. (6). 473-477.
- [4] Peterson C., Hillberry B., Heck D.: "Component wear of total knee prostheses using Ti-6Al-4V, titanium nitride coated Ti-6Al-4V, and cobalt-chromium-molybdenum femoral components". J. Biomed. Mater. Res. 1988. 22. 887-903.

are present. In the samples with layers only reflections from the layers are obtained, what proves their thickness is about few microns. The more carbon in the layer, the more visible is the translation of the peak in the direction of titanium carbide. In the layer from titanium nitride, the peak is visible on $2\theta \sim 42.83$ deg. The presence of 5.68% at.C moves the peak to the value of $2\theta \sim 42.59$ deg, and even more carbon content (11.10%at.C) to the value of $2\theta \sim 42.31$ deg.

The analysis of the curves presented in FIG. 3 confirms that the titanium nitrides and nitrocarbides improve not significantly the corrosion resistance of the WIRONIT alloy. No substantial differences of the corrosion resistance of the layers of nitrides and nitrocarbides on these alloys were observed. Passive area, greater in case of the coated layers, is visible on the potentiodynamic curves. Samples covered with the titanium nitrocarbides layers behave similarly to layers samples coated with titanium nitride as far as the type of the corrosion is concerned.

Small improvement of corrosion resistance of the examined layers can also result from their porosity, which significantly deteriorates tightness of the layers and in the same time its corrosion resistance.

References

- [5] Thull R.: "Korosionseigenschaften mit Titan-Niob-Oxinitrid beschichteter Dentallegirungen" Dtsch. Zahnärztl. Z. 1991. 46. (11) 712-717.
- [6]. Wisbey A., Gregson P., Tuke M.: "Application of PVD TiN coating to Co-Cr-Mo based surgical implants" Biomaterials 1987. 8. (6). 477-480.
- [7]. Walkowicz J., Bujak J., Miernik K., Smolik J.: "Badania trwałościowe powłok TiN, TiC/Ti(C.N)/TiN" Nowoczesne Technologie w Inżynierii Powierzchni. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Łódź - Spała 20-23. 09. 1994 Kwadrat Łódź 1994. 219-224.
- [8]. Januszewicz B., Klimek L.: Investigation of TiCN coatings on steel substrates deposited by means of low pressure cathode ARC technique, Acta Metallurgica Slovaca, 10, 2004, s. 926-929.

MIKROSKOPOWA OCENA ZUŻYCIA POWIERZCHNI CEWNIKÓW DOTĘTNICZYCH

LESZEK KLIMEK*, WALDEMAR MACHAŁA**

*INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ,
UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA
**ZAKŁAD ANESTEZJOLOGII I INTENSYWNEJ OPIEKI MEDYCZNEJ
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁÓDZI;
UNIWERSYTECKI SZPITAL KLINICZNY NR 2,
ŻEROMSKIEGO 113, 90-549 ŁÓDŹ, POLAND

Streszczenie

Umieszczenie cewnika (kaniula) w naczyniu krewnośnym (kaniulacja żyły/tętnicy), jest podstawowym

MICROSCOPE EVALUATION OF ARTERIAL CANNULA EROITIVE WEAR

LESZEK KLIMEK*, WALDEMAR MACHAŁA**

*TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE, UL. STEFANOWSKIEGO 1/15, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND
**MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, DEPARTMENT OF ANAESTHESIOLOGY AND INTENSIVE CARE, UNIVERSITY HOSPITAL NO 2, ŻEROMSKIEGO 113, 90-549 ŁÓDŹ, POLAND

Abstract

Introduction of a cannula into a blood vessel (venous/arterial cannulation) is a basic procedure in modern medicine. Cannulas must meet high require-

zabiegem wykonywanym we współczesnej medycynie. Kaniulom stawia się szczególnie wymagania, które mają ograniczyćczęstość występowania powikłań. Materiał, z którego wykonany jest cewnik powinien być dobrze tolerowany przez organizm. Na uszkodzenia mechaniczne narażone są przede wszystkim cewniki tężnicze (znajdują w tzw. przeciwpiądradzie do przepływającej krwi, co predysponuje czoło kaniuli do mechanicznych uszkodzeń przez upostaciowane elementy krwi). Powszechność kaniulacji powinna wymuszać badania nad zachowaniem się kaniuli w kontakcie z przepływającą krwią, a w szczególności zużywanie się ich, predysponujące do występowania powikłań. W pracy przedstawiono wyniki badań zużycia powierzchni kaniuli przebywających organizmie pacjenta do 14 dni. Obserwowane na powierzchni kaniuli zużycie ma charakter zużycia erozyjnego. Uwzględniając właściwości i wielkość płytka krwi, zagęblenia w powierzchni hemozgodnych materiałów nie powinny być większe niż $0,2\text{ }\mu\text{m}$. W praktyce jednak trudno otrzymać wyroby spełniające ten wymóg. Przy takiej powierzchni znacznie wzrasta skłonność do tworzenia zakrzepów na powierzchni kaniuli, co jest zjawiskiem niebezpiecznym dla pacjenta. Autorzy w swojej pracy przedstawili wstępne wyniki badań, w których wykazali zależność pomiędzy czasem przebywania kaniuli w ustroju, a stopniem jej mechanicznego zużycia. Badania takie pozwalają na określenie maksymalnego czasu, jaki mogą przebywać cewniki w naczyniach tężniczych bez zagrożenia powstania zakrzepu spowodowanego uszkodzeniem powierzchni.

Słowa kluczowe: kaniule, elektronowy mikroskop skaningu, zużycie powierzchni

[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 43-46]

Wstęp

W ciągu ostatnich kilku lat obserwuje się tendencję do rozszerzania wskazań do kaniulacji naczyń krewiennych [1, 2]. Najczęściej czynności te wykonywane są w ratownictwie medycznym, w oddziałach anestezjologii i intensywnej terapii i oddziałach ostrych zatruc. Za kaniulację zwykle się uważać wprowadzenie do układu naczyniowego cewnika, dzięki któremu istnieje możliwość: pobierania krwi, podawania leków, przetaczania płynów, prowadzenia terapii (np. nerkozastępczej, zabiegów koronaroplastyki) oraz monitorowania pacjenta. Kaniule wprowadzane są zarówno do żył, jak i do tężnic [2, 3].

Przez kaniulację naczynia tężniczego (wysokociśnieniowego i wysokooporowego) rozumie się przede wszystkim nakłucie i wprowadzenie cewnika do tężnicy promieniowej (gazometria i monitorowanie ciśnienia tężniczego krwi tzw. systemowego), rzadziej tężnicy grzbietowej stopy [4] oraz przy określonych wskazaniach do tężnicy płucnej (cewnik Swan'a-Ganz'a - dla monitorowania parametrów odczytywanych z monitora rzutu serca) [5]. Rozwój kardiologii i radiologii interwencyjnej coraz częściej związany jest z nakluwaniem tężnic dla wykonania zabiegów takich chociażby, jak koronarografia i koronaroplastyka.

Kaniulacja oznacza pozostawienie w naczyniu heterogennego materiału. Cewnikom naczyniowym stawia się, więc szczególnie wymagania, które mają ograniczyćczęstość występowania powikłań związanych z cewnikowaniem [6, 10]. Materiał, z którego wykonany jest cewnik powinien być dobrze tolerowany przez organizm (biozgodny) i trombozgodny tj. na jego powierzchni nie powinny tworzyć się zakrzepy (wytrącanie się fibryny na powierzchni kaniuli po-

ments in order to decrease the number of complications - they must be well tolerated by patient's organism. Especially arterial cannulas are at risk of mechanical damage (they are in a "counter current" to blood flow) which predisposes the head of cannula to mechanical damage by morphotic blood elements. Common use of cannulas should encourage studies investigating cannula's reactions to blood flow and it should focus on cannula wear leading to complications. It facilitates examination of material damage and material wear and it could also be used for examining arterial cannulas. Cannula wear observed at cannula surface is called erosive wear. Considering size and properties of platelets - it has been assumed that excavations in surface of homocompatible materials should not exceed $0,2\text{ }\mu\text{m}$. In spite of these suggestions it is difficult to obtain products meeting such requirements which increases the risk of forming clots on cannula's surface. Study authors presented preliminary study results which proved interdependence between time of cannula stay in organism and a degree of cannula mechanical wear. Such studies allow to estimate the maximal time of cannula stay in arterial vessels, avoiding risk of clots caused by surface damage.

Key words: cannula, scanning electron microscope, surface wear

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 43-46]

Introduction

A tendency to extend therapeutic indications of arterial cannulation has been observed over the recent years [1, 2]. This type of medical procedures are most common in Emergency Medical Service, at Intensive Care and Acute Poisoning Units. Cannulation has been usually defined as the process of cannula insertion into a vascular system enabling medical staff to take blood, apply medication, transfuse liquids, administer various therapies (i.e. renal replacement therapy, coronaryoplasty) and to monitor patient's condition. Cannulas may be introduced both into veins and arteries [2, 3].

Arterial cannulation (high-pressure and high-resistance) has been most often described as performing an arterial puncture and inserting the cannula into radial artery (gasometry and monitoring of arterial blood pressure), exceptionally into dorsal foot artery/dorsalis pedis artery [4] and in certain indications a cannula could be also inserted into pulmonary artery (Swan-Ganz catheter - for monitoring cardiac output monitor parameters) [5]. The development of cardiology and intervention radiology often entails puncturing of arteries in order to perform various surgical procedures i.e. coronary angiography or coronaryoplasty.

Cannulation also entails the necessity of leaving heterogeneous material in a blood vessel. Therefore, cannulas must meet high requirements in order to decrease a number of complications occurring as a result of this process [6, 10]. The substance of which cannulas are made should be well tolerated by patient's organism (biocompatible) and also atrombogenous - clots should not be formed on cannula's surface (precipitation of fibrin on cannula's surface may cause release of clots which, in turn, may block small blood vessels and lead to infarctions - especially pulmonary infarction and brain stroke). The material should also have proper mechanical strength/endurance/resistance facilitating infusion by both methods: gravitation/al and pressure pump method. Furthermore, the structure of cannula's surface is also of great importance due to the fact that it

wodować może uwalnianie się zatorów, które zamykając małe naczynia prowadziły będą do zawałów - przede wszystkim płuc i mózgu). Materiał ten powinien również posiadać odpowiednią wytrzymałość mechaniczną odpowiadającą, z wystarczającym zapasem określonym warunkom lewu - najczęściej do układu żylnego (gravitacyjny, pod ciśnieniem). Duże znaczenie ma też struktura powierzchni cewnika, która wpływa na skłonność do powstawania i szerzenia się zakrzepów [3]. Wskazana jest możliwie największa gładkość powierzchni, ponieważ jak wykazały badania wielu materiałów, zmniejszenie gładkości, a więc rozwinięcie powierzchni jest decydującym czynnikiem powodującym zwiększenie ryzyka tworzenia się zakrzepów [7]. Ważne jest, aby wszystkie te właściwości cewnika nie zmieniały się podczas jego przebywania w ustroju. Współczesne cewniki wykonane są z materiałów takich, jak teflon, poliuretan, elastomer silikonowy, polietylen lub polipropylen [2].

Czas bezpiecznego przebywania cewnika w organizmie człowieka jest różnie długi. Uważa się, że np. cewniki z polichlorku winylu (PCV) nie powinny przebywać w naczyniu dłużej niż 5-7 dni; a kaniule silikonowe i teflonowe 14 dni. Ograniczenie czasu utrzymywania kaniuli w naczyniu wynika przede wszystkim z przyczyn infekcyjnych. Od kilku lat funkcjonują na rynku cewniki impregnowane związkami srebra, sulfatiazynami i chlorheksydyną [2], które wykazują długotrwały efekt przeciwbakteryjny i mogą być utrzymywane w organizmie nawet 4 tygodnie [8]. Zasady aseptyki i antyseptyki nakazują usunięcie cewnika z naczynia krwionośnego w sytuacji, w której stwierdza się znamiona infekcji w okolicy wprowadzenia go do naczynia.

Cewnik, który wprowadzono do naczynia narażony jest na m. in. mechaniczne oddziaływanie przepływającej krwi (przez elementy morfotyczne). Z cewników dożylnych i do-tętniczych szczególnie narażone są te ostatnie, z uwagi na wyższe ciśnienie krwi oraz inne usytuowanie w stosunku do przepływającej krwi [9]. Czoło kaniuli tętniczej ustawione jest w tzw. przeciwprowadzie do przepływającej krwi, co może w konsekwencji spowodować jej mechaniczne uszkodzenie.

Materiał i metoda

Mając na względzie możliwość zużycia cewników naczyniowych autorzy przeprowadzili badania wstępne (pilotowe) kaniul tętnicznych, które były wprowadzane u ludzi techniką Seldingera. Badane kaniule wykonane były z polichlorku winylu. Wszystkie oceniane kaniule wyprodukowane zostały przez tą samą firmę. Kaniulacji dokonywała jedna osoba dbając o to, by technika wprowadzania była podobna u wszystkich pacjentów. Przeprowadzono badania porównawcze kaniul nowych oraz przebywających w organizmie pacjenta 7 i 14 dni. Badania wykonano w mikroskopie elektronowym Hitachi S-3000 N przy powiększeniach od 40x do 5000x. Obserwowano zarówno powierzchnie zewnętrzne kaniul jak i ich przekroje.

Obrazy porównawcze powierzchni zewnętrznej nowych przedstawiono na RYS. 1a-b, natomiast używanych na RYS. 2a-b.

W celu oszacowania głębokości powstałych ubytków na powierzchni kaniuli wykonano obserwacje ich przekrojów poosiowych. Wyniki przedstawiono na RYS. 3a-b oraz 4a-d.

Omówienie wyników

Na powierzchniach używanych cewników obserwuje się zużycie w postaci różnej wielkości ubytków materiału kaniuli. Charakter ubytków materiału oraz analiza warunków

may influence formation and spreading of clots [3]. The cannula's surface should be as smooth as possible since it has been proved that the decrease of surface smoothness is the most vital factor leading to increase of forming clots [7]. It is essential that all those properties of a cannula remained unchanged during cannula's stay in the organism. Modern cannulas are made of teflon, polyurethane, silicone elastomer, polyethylene or polypropylene [2].

Time length of safe stay of a cannula in human organism may vary. It is considered that cannulas made of i.e. polyvinyl chloride (PCV) should not remain in a blood vessel for longer than 5-7 days; silicone and teflon cannulas not longer than 14 days. Limitation of cannula's stay in a vessel is usually connected to infections. Cannulas impregnated with silver compounds, sulphatazines and chlorhexidine has been recently available on the market [2]. They show to have long-term antibacterial effect and they may remain in the organism for up to 4 weeks [8]. Principles of aseptics and antiseptics recommend to remove the cannula from the vessel when symptoms of infection are recognised around the puncture where cannula was inserted.

A cannula introduced into the vein is at risk of mechanical damage i.e. caused by morphotic elements of flowing blood. Heads of arterial cannulas are particularly at risk of mechanical damage as they are positioned in a "counter current" to blood flow [9].

Material and method

Taking cannula wear into consideration study authors performed preliminary examination of arterial cannulas introduced into patients' blood vessels by Seldinger technique. All tested cannulas were made of polyvinyl chloride and they were produced by the same company. One person performed cannulation taking great care so that cannulas were inserted in possibly the same manner with each patient. Next, a comparative examination of cannulas was performed - new cannulas and those after 14-day-stay in patients' organism were compared. The tests were carried out using Hitachi S-3000 N electron microscope, magnified from 40x to 5000x and both external surface and (cross) section of cannulas were observed.

Results

Comparative pictures presenting the surface of new cannulas are shown on FIGS. 1a-b, FIGS. 2a-b present the surface of used cannulas.

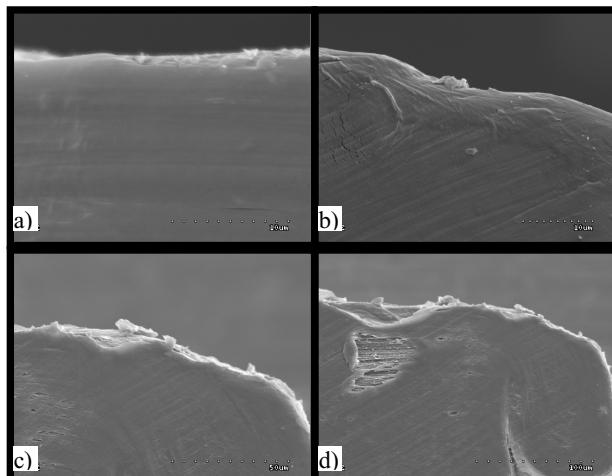
Moreover, in order to evaluate the depth of excavations on the surface observation of cannulas' longitudinal section was also performed. The results are presented on FIGS. 3a-b and 4a-d.

Various sizes and types of material loss observed on the surface of used cannulas analysed under various conditions prove the occurrence of erosive wear. Considering properties and size of platelets - it has been assumed that excavations on the surface of homocompatible materials should not exceed 0,2 μm in order to avoid formation of blood clots [10]. Material loss on the head of cannula presented on FIGS. 2 a-b and 4 a-d and also on lateral surface of cannula is many times/significantly bigger and it was estimated during the examination from 2 to 20 μm, depending on the length of cannula's stay in the organism. Therefore, it could be concluded that cannula's surface has significant impact on formation of clots on the cannula which could appear to be dangerous for the patient.

Proper evaluation on cannula's condition after various

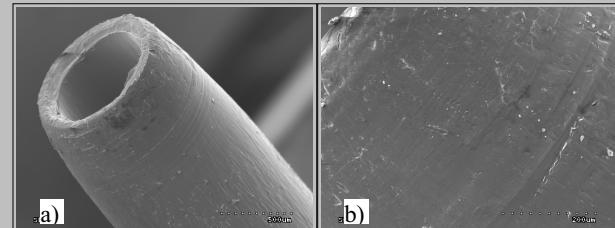
pracy wskazują na erozyjne zniszczenie powierzchni kaniuli. Uwzględniając właściwości i wielkość płytka krwi, zagłębienia w powierzchni hemozgodnych (biozgodnych) materiałów nie powinny być większe niż $0,2\text{ }\mu\text{m}$, w przeciwnym razie mogą powodować zakrzepy [10]. Widoczne na RYS. 2a-b i 4a-d ubytki materiału na czołach oraz na powierzchni bocznej kaniuli są wielokrotnie większe i w badanych kaniulach wynosiły od 2 do $20\text{ }\mu\text{m}$ w zależności od czasu przebywania w organizmie pacjenta. Można, więc stwierdzić, że przy takiej powierzchni znacznie wzrasta skłonność do tworzenia zakrzepów na powierzchni kaniuli, co jest zjawiskiem zdecydowanie niekorzystnym, a nawet niebezpiecznym dla pacjenta.

Oceniając stan cewników różnie długo przebywających w naczyniu - można śledzić postępowanie procesu ich zużywania się w czasie. Badania takie pozwolą na określenie maksymalnego czasu, jaki mogą przebywać cewniki tężnicze w naczyniu, bez ryzyka powstania zakrzepu na ich powierzchni. Ponieważ kaniula służy m.in. do monitorowania parametrów hemodynamicznych, rejestrowanych w sposób ciągły - można powiązać procesy zużycia z parametrami przepływającej krwi np. liczbą elementów morfotycznych (erytrocyty, leukocyty, płytki krwi) i parametrami krzepnięcia (INR, APTT, fibrynogen).

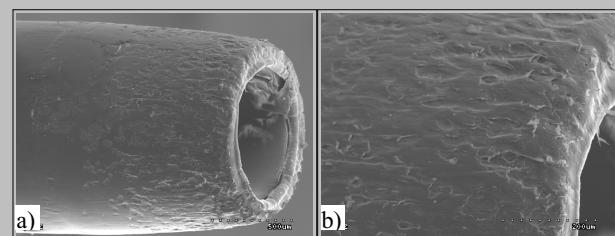


RYS. 4. Przekroje poosiowe kaniuli używanej.
FIG. 4. Longitudinal sections of used cannulas.

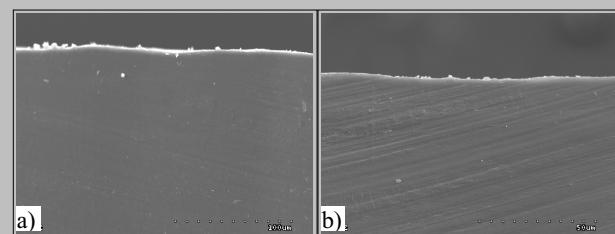
length of stay in the artery - allows to trace the process of cannula's wear. The study allows to estimate the maximal time of cannula stay in arterial vessels and to avoid the risk of clotting. Due to the fact that cannulas are used to monitor haemodynamic parameters registered continuously - it proves logical to connect erosive wear with the parameters of passing blood, i.e. the number of morphotic elements (erythrocytes, leukocytes, platelets) and also with clotting parameters (INR, APTT, fibrinogen).



RYS. 1. Powierzchnia czoła nowej kaniuli.
FIG. 1. Surface of new cannula's head.



RYS. 2. Powierzchnia czoła kaniuli używanej 14 dni.
FIG. 2. Surface of cannula's head used for 14 days.



RYS. 3. Przekrój poosiowy nowej kaniuli.
FIG. 3. Longitudinal section of new cannulas.

Piśmiennictwo

- [1] Larsen R.: Anestezjologia. Wydawnictwo Medyczne Urban&Partner. Wrocław 2003.
- [2] Internetowy Serwis Toksykologii Klinicznej - http://etox.2p.pl/bottom/chory_nieprzyt_kaniulacja.html
- [3] Grundman U., Simon J.: "Wklejki dołyne i przetaczanie płynów" Bibliomed Wydawnictwo Medyczne Sp. z o.o., Melsungen 1991.
- [4] Martin C., Saun P., Papazian L., Gouin F.: Long-term arteria cannulation In ICU patients usuing the radial artery or dorsalis pedis artery. Chust 2001; 199 (3): 901-906.
- [5] Practice guidelines for pulmonary artery catheterisation; a report by the American Society of Anesthesiologist task force on pulmonary artery catheterisation. Anesthesiology 1993; 78 (2): 380-394.
- [6] Durbin Ch.G.: Radial arterial lines and sticks: what are the risk? Respiratory Care Journal on-line: <http://www.rcjournal.com/contents/03.01/03.01.0229.asp>

References

- [7] Hecker J. F., Scandrett L. A.: Roughnes and trombogenicity of the outer surfaces of intravascular catheters. J. Biomed. Mater. Res. 1985; 19: 381-395.
- [8] Veenstra D., Saint S., Saha S.: Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters In preventing catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. Journal of American Medical Association. 1999; 281: 261-267.
- [9] Frejza E.E., Mezghbe H.: Indications and complications of arteria catheter use In surgical or medical intensive care units: analysis of 4932 patients. American Journal of Surgery 1998; 64: 127-131.
- [10] Nałęcz M. (red): "Problemy biocybernetyki i inżynierii biomedycznej" Tom 4 "Biomateriały" Wydawnictwo Komunikacji i Łączności Warszawa 1990, s 175.

MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA ELEKTRONOWEGO MIKROSKOPU SKANINGOWEGO W BADANIACH MATERIAŁÓW STOMATOLOGICZNYCH

KLIMEK LESZEK*, SOKOŁOWSKI JERZY**, KOZAKIEWICZ
MARCIN***, ŁĘSKI MICHał ****, BANASZEK KATARZYNA****

***POLITECHNIKA ŁÓDZKA, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
ul. STEFANOWSKIEGO 1/15 902924 ŁÓDŹ**

UL. STEFANOWSKIEGO 1/13, 90-794 ŁÓDŹ,
**UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI, ZAKŁAD PROPEDEUTYKI
STOMATOLOGICZNEJ INSTYTUTU STOMATOLOGII, UL. POMORSKA
251 92-213 ŁÓDŹ.

***UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI, ZAKŁAD CHIRURGII
SZCZEKOWEJ I INSTYTUTU CHIRURGII

SZCZĘKOWEJ INSTYTUTU CHIRURGI,
UL. KOPCIŃSKIEGO 22, 90-153 ŁÓDŹ,
****UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁÓDZI, ZAKŁAD ENDODONCJI
KATEDRY STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ, ENDODONCJI I PERIO-
DONTOLOGII, UL. POMORSKA 251, 92-213 ŁÓDŹ

DENTOLOGII, UL. TUMORSKA 23/1, 32-215 LUBLIN,

Streszczenie

Nowoczesnym materiałem stomatologicznym stawiane są coraz to wyższe wymagania. Przechodzą one cały szereg testów zanim zostaną zastosowane w chirurgii szczękowej czy w stomatologii zachowawczej. Do badań tych używa się całego szeregu różnorodnych metod. W prezentowanej pracy przedstawiono możliwości zastosowania elektronowego mikroskopu skaningowego do badań materiałów stomatologicznych. Pokazano przykłady badań materiałów stosowanych na wypełnienia stomatologiczne, ocenę przygotowania powierzchni w protetyce stomatologicznej, ocenę sposobów opracowywania ubytków, badania fraktograficzne implantów stomatologicznych. Z przedstawionych przykładów wynika, że elektronowy mikroskop skaningowy może być cennym urządzeniem znacznie rozszerzającym możliwości badawcze materiałów stosowanych w stomatologii.

Słowa kluczowe: elektronowy mikroskop skanujący, materiały stomatologiczne, badanie materiałów
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 47-52]

Wstęp

We współczesnej stomatologii stosuje się cały szereg różnorodnych materiałów należących zarówno do ceramiki jak i tworzyw metalicznych oraz sztucznych. Tworzywa te mają różne właściwości a tym samym różne zastosowanie np. wytwarzanie protez, wszczepów, uzupełnianie ubytków zębowych, leczenie zachowawcze itp. Sama znajomość właściwości już nie wystarcza, prawidłowe projektowanie, dobór i stosowanie tych materiałów wymaga także znajomości ich zachowania w organizmie pacjenta. W tym celu prowadzi się badania kliniczne, chociaż niektóre zachowa-

POSSIBILITIES OF SCANING ELECTRON MICROSCOPE APPLICATION FOR STOMATOLOGICAL AND ORAL SURGICAL MATERIAL INVESTIGATIONS

KLIIMEK LESZEK*, SOKOŁOWSKI JERZY**, KOZAKIEWICZ
MARCIN***, ŁĘSKI MICHał ****, BANASZEK KATARZYNA****

*TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ INSTITUTE OF MATERIALS
ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/15, 902924 ŁÓDŹ, POLAND

ENGINEERING, STEFANOWSKIEGO 1/13, 90-924 ŁÓDŹ, POLAND
**DEPARTMENT OF PROPEDEUTICS OF DENTISTRY, INSTITUTE OF
DENTISTRY, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
UL. POMORSKA 251, 92-213 ŁÓDŹ.

***DEPARTMENT OF MAXILLOFACIAL SURGERY, INSTITUTE OF SURGERY, MEDICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

UL. KOPCIŃSKIEGO 22, 90-153 ŁÓDŹ
****DEPARTMENT OF ENDODONTICS, MEDICAL UNIVERSITY OF
ŁÓDŹ, UL POMORSKA 251, 92-213 ŁÓDŹ, POLAND

Summary

Novel stomatological materials are requested for more and more sophisticated parameters. Additional evaluation procedures for describing of special dental surgery features are needed to establish the material usefulness and permit dental application. These evaluations are performed by employment of many different methods depending on kind of the parameter. In this article the possibilities of scanning electron microscope [SEM] utilisation for assessment of selected features of materials used in stomatology were presented. Shown here images which source was SEM visualised examples of this microscope options. It is worthy to indicate, that use of SEM give us numerous valuable information regarding materials. As far as this tool is considered all dental specialties find support at material examinations, especially conservative dentistry, prosthodontics, oral and maxillofacial surgery.

Key words: scanning electron microscope, stomatological and oral surgical material, material investigations

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 47-52]

Introduction

Huge number of different materials belonging to ceramics and metals as well as synthetic ones are employed at novel dentistry. These materials have different features and thus different clinical applications e.g. dentures manufacture, production of dental implants, restorative fillings, endodontics etc. Only knowledge of physicochemical features is not sufficient now, proper designing, selection and application of these materials requires the knowledge of their fates in the vital organism. That is why the clinical investi-

nia się materiałów można przewidzieć bez prowadzenia tych badań. Przykładowo pojawienie się szczeliny pomiędzy tkankami zęba a wypełnieniem pozawala na wnikanie drobnoustrojów w głąb, a tym samym jest przyczyną niepowodzeń klinicznych, niewłaściwe przygotowanie powierzchni mostów może powodować brak trwałego połączenia pomiędzy częściami metalowymi a żywicą. Zagadnień tego typu jest znacznie więcej. Dotyczą one zarówno samych materiałów i ich przygotowania, jak i właściwego opracowania tkanek zęba przed dalszymi zabiegami. Nie wszystkie z tych zagadnień da się do końca rozwiązać bez badań klinicznych, jednak przed rozpoczęciem tych badań można pokuścić się o przewidywanie zachowań materiałów na podstawie innych badań, takich jak np. obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym. Elektronowy mikroskop skaningowy jest urządzeniem, które znalazło szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, w tym także w stomatologii. Pozwala on na obserwację powierzchni preparatów w bardzo szerokim zakresie powiększeń (od kilku razy do kilkudziesięciu tysięcy).

Cel pracy

Celem pracy jest pokazanie, na możliwie szerokiej gamie przykładów, możliwości zastosowania elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) w stomatologii. Z uwagi jednak na obszerność problemu zastosowanie to dotyczyć będzie głównie zagadnień związanych z badaniami materiałów stosowanych w stomatologii.

Metodyka badań

Elektronowy mikroskop skaningowy jest urządzeniem, które w większości przypadków nie wymaga skomplikowanej przygotowywanej preparatyki. Preparatom, które mają być poddane obserwacjom stawia się następujące wymagania:[1]

- odporność na zjawiska związane z oddziaływaniami wiążki elektronów,
- odporność na wysoką próżnię,
- przewodnictwo elektryczne,

Ostatnie dwa warunki nie są jednak tak rygorystycznie wymagane, bowiem konstrukcja niektórych współczesnych mikroskopów pozwala na obserwację w obniżonej próżni oraz przy bardzo szerokim zakresie napięć przyspieszających (od kilkuset do kilku tysięcy V). Preparaty stomatologiczne są odporne na działanie próżni i zjawiska związane z oddziaływaniami wiążki elektronów, tak więc nie ulegają zniszczeniu w mikroskopie. Jeśli chodzi o przewodnictwo, to w przypadku materiałów metalowych nie stanowi ono problemu (metale są przewodnikami). Natomiast tkanki zęba czy tworzywa kompozytowe itp., które nie są materiałami przewodzącymi, to przed obserwacją w SEM pokrywano je warstwą złota lub stopu platyna pallad. Obserwacje prowadzone na elektronowych mikroskopach skaningowych PHILIPS SEM 5001 i HITACHI S-3000N. Ten ostatni wyposażony był w wersję pozwalającą obserwować preparaty przy obniżonej próżni. Wyniki obserwacji zamieszczono na RYS. 1-7.

Wyniki obserwacji

Stosunkowo szerokie zastosowane ma ocena w elektronowym mikroskopie skaningowym właściwego sposobu przygotowania zarówno obrabianych powierzchni zęba jak i np. elementów retencyjnych szyn, mostów itp. w celu dobrania odpowiednich technik przygotowania metalowych powierzchni konstrukcji protetycznych zapewniających ich

gurations are still performing, despite of known some habitations are predicted without the clinical trials. For instance the presence of marginal leakage and fissure between restoration and the hard tissues of the tooth makes possible bacteria colonization and invasion. This leads to clinical failure. Not proper conditioning of the fixed prosthesis surfaces makes impossible to produce the stable adhesion metal elements to the resin ones. Such as this problem are much frequent. One considers as well strictly the materials and its preprocessing, as suitable preparing the tooth structures before the later operations. Only part of these problems may be solved without clinical investigations, however materials behaviour could be predicted before the beginning of clinical investigation basing for instance on scanning electron microscope examination. Scanning electron microscope is the apparatus which is widely used in many scientific fields including dentistry. One can observe surfaces of materials within huge range of magnifications (from few folds to several thousands fold).

Aim of study

The aim of this study was the presentation, in as numbered cases as it was possible, the possibilities of scanning electron microscope application in dentistry. Due to the wide-spreadness of the problem, authors decided to show mainly examination of materials used in dentistry.

Method of study

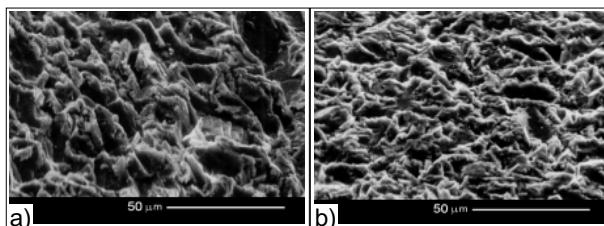
Preparation performance for scanning electron microscope can be normally made in very simple way. Requirement for materials for this observing technique are as follow [1]:

- resistance to effects produced by electron stream,
- resistance to high vacuum,
- electric conductivity,

The last 2 conditions are not restricted because a construction of many modern models of scanning electron microscope make observations in low vacuum possible. Moreover widen range of acceleration voltage is now applied (from hundreds to few thousands volts) [2]. Dental materials are resistant to vacuum influence as well to effects produced by electron stream. Thus, they are not destructed inside the microscope. As far as the electric conductivity is concerned the metals used in dentistry are not difficult to examining (metals are the electric conductors). In case of tooth tissues or composite filling materials etc, which are not the conductors authors covered them by gold platinum-palladium alloy layer to make SEM observation possible. The observations were performed in PHILIPS SEM 501 and HITACHI S-3000N scanning electron microscopes. The last one was supported in option of low vacuum visualization. The results of our observation were presented in the FIGS. 1-7.

Results of observations

Relatively often applications of scanning electron microscope are in evaluation of the proper mean of preparations of as mechanically treated tooth surfaces as well retentive parts of splits, prosthetic bridges etc. for selection the best preparation techniques of metal surfaces of the prosthetic constructions due to strong connection one another. The proper pre-processing of these surfaces guarantees the stable clinical output. One of the main factors describing the metal-to-hard-tooth-tissues adhesion is surface expansion,



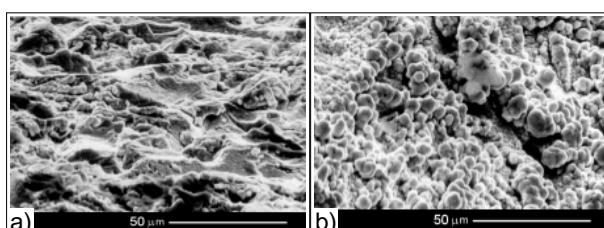
RYS. 1. Obraz powierzchni stopu Super Fluid piaskowanego: a) węglikiem krzemu SiC 98C100, b) korundem zwykłym Al_2O_3 95A100.
FIG. 1. Surface view of Super Fluid alloy blasted by: a) SiC 98C100, b) Al_2O_3 95A100.

wzajemne właściwe połączenie. Właściwe przygotowanie tych powierzchni warunkuje uzyskanie klinicznie trwałych połączeń z tkankami zęba. Jednym z czynników decydujących o wielkości adhezji jest rozwinięcie powierzchni, które najczęściej uzyskuje się drogą obróbki strumieniowo-ściernej. Jej efekty mogą być ocenione przez pomiar chropowatości lub przez obserwację powierzchni w elektronowym mikroskopie skaningowym, przy czym ocena w elektronowym mikroskopie skaningowym jako dająca więcej informacji jest pełniejsza. Przykładowo tylko w SEM można ocenić ilość tzw. negatywowych podcięć, w które wnika żywica mocująca tworząc trwałe połączenie [2]. Przykładowe różnice w wyglądzie powierzchni poddanych piaskowaniu różnym ścierniwem pokazano na RYS. 1.

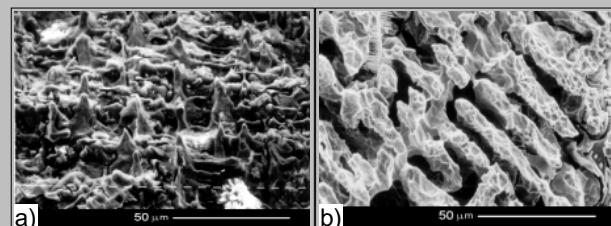
Innym sposobem rozwinięcia powierzchni jest trawienie. Także tutaj określenie jakości wytrawionej powierzchni poprzez jednoznaczne określenie efektów trawienia może być dokonane tylko w oparciu o analizę struktury powierzchni w SEM [2]. Właśnie to doprowadziło do opracowania przez Livaditis i Thompsona [3] technik trawienia elektrolitycznego stopów Cr-Ni, Cr-Ni-Be, Cr-Co umożliwiając wytwarzanie połączeń żywic z elementami mocującymi mostów - tzw. Mosty Maryland. Różnice wyglądzie stopu Wiron 88 po różnych procesach trawienia przedstawia RYS. 2.

Mikroskop skaningowy można z powodzeniem zastosować także do oceny jakości nałożonych warstw pośrednich, jak np. warstwy cyny na uprzednio piaskowaną powierzchnię [2]. Warstwy te po późniejszym utlenieniu dają bardzo porowatą powierzchnię, która po umożliwia tworzenie się chemicznego połączenia pomiędzy żywicą a zhydrolizowaną cyną. Przykładowe obrazy takich powierzchni przedstawiono na RYS. 3.

Kolejnym zastosowaniem mikroskopu jest ocena szczelności wypełnień wykonanych różnymi metodami [4, 5]. Obserwacje pozwalają na ustalenie wielkości oraz przebiegu



RYS. 3. Struktura powierzchni piaskowanego stopu Super Fluid po pokryciu: a) warstwą cyny przy napięciu 6V, b) dwiema warstwami cyny przy napięciach 6V i 9V.
FIG. 3. Surface structure Super Fluid alloy blasted after coved by: a) Tin layer, voltage 6V, b) two layers of tin, 6V and 9V.



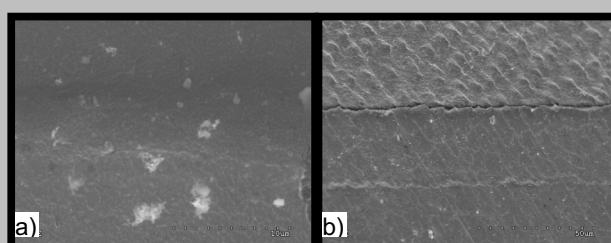
RYS. 2. Struktura powierzchni stopu Wiron 88 trawnionego chemicznie: a) 10 minut, b) 60 minut.
FIG. 2. Surface structure Wiron 88 alloy chemically etched: a) 10 minutes, b) 60 minutes.

which is reached mostly by the stream-abrasive treatment. Effects of this technique action can be assessed by roughness measurement or by mean the observation in scanning electron microscope. It is well to know that SEM evaluation deliver to observer the more amount of information. For example, number of so called negative retention channels in which the resin is free to flow in to produce the stable connection only in scanning electron microscope can be evaluated [3]. Beneath the differences in presence of the surfaces that was sand blasted by two different type of granules are shown on FIG. 1.

The next mean of surface expansion is etching. Also in this technique, to describe the quality of the etched surface by objective assess the effects of etching, SEM surface structure analysis is only one reliable way [3]. Just this had led Livaditis's and Thompson's [4] to worked out electrolytic etched technique of Cr-Ni, Cr-Ni-Be, Cr-Co alloys and synthesis of resins for connection the bridges elements to dentition - Maryland bridges. The differences of appearance Wiron 88 alloy after different etched processes are presented in FIG. 2.

Scanning microscope can be easily used to evaluation of quality of the intermediate layers, for instance tin layers on the previously sand blasted surface [3]. After subsequent oxidation these layers express very porous surface, which makes possible the chemical connection between a resin and hydrolysed tin. The examples of these surface images are presented in FIG. 3.

Next application of scanning electron microscope is marginal leakage evaluation of the dental fillings performed in different methods [5, 6, 7]. This observation showed dimensions and localization of the fissures between filling material and the tooth. Furthermore, it is possible to accurately measure the width of the fissure due to application of series



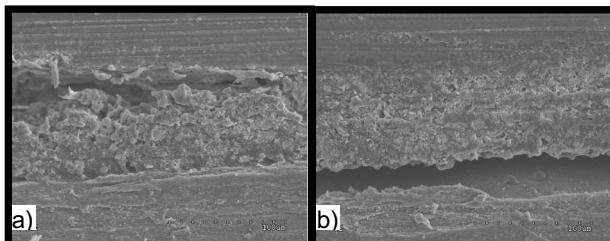
RYS. 4. Granica pomiędzy wypełnieniem a tkankami zęba: a) brak wyraźnej granicy pomiędzy tkankami zęba a materiałem wypełniającym, b) wyraźna szczelina pomiędzy tkankami zęba a materiałem wypełniającym.
FIG. 4. The border between dental filling and tooth tissues: a) Lack of visible border between dental filling and tooth tissues, b) Well revealed the fissure between dental filling and tooth tissues.

szczelin między materiałem wypełniającym a tkankami zęba. Ponadto stosując różne powiększenia możemy bardzo precyjnie pomierzyć ich szerokość. Daje to możliwość oceny zarówno jakości materiału jak i techniki przygotowania ubytka. Suliborski [7, 8] porównując siły adhezji między materiałem odtwórczym a powierzchnią zęba przygotowaną różnymi metodami oprócz badań wytrzymałościowych obserwował w elektronowym mikroskopie skaningowym powierzchnie rozdzielcze uzyskane po próbie zrywania. Badania te pozwoliły na określenie miejsca w którym nastąpiło zerwanie (pęknięcie zęba, materiału odtwórczego, szkliw lub granic między nimi). RYS. 4 przedstawia widok wypełnień wykonanych różnymi materiałami. Wyraźnie widać na nim różnice występujące pomiędzy nimi. Na RYS. 4a nie tylko brak jest szczeliny między materiałem wypełniającym a tkankami zęba ale także trudno jest zauważać granicę między nimi. Świadczy to o dobrych właściwościach materiału oraz o właściwym przygotowaniu ubytka. Natomiast na RYS. 4b widoczna jest wyraźna szczelina, która może dyskwalifikować to wypełnienie.

Ponadto mamy możliwość oceny nie tylko jakości wypełnienia ale także poszczególnych składników materiału wypełniającego. RYS. 5 pokazuje różny przebieg nieciągłości pomiędzy ćwiekiem wypełniającym kanał zębowy a zębinią. Obraz przedstawiony na RYS. 5a pokazuje przebieg szczeliny pomiędzy zębinią a pastą uszczelniającą natomiast RYS. 5b między pastą uszczelniającą a ćwiekiem. Informacje te mają istotne znaczenie dla oceny jakości zastosowanych materiałów.

Z zachowaniem szczelności wypełnień nieodłącznie wiążę się właściwa obróbka ubytka. I tutaj także elektronowy mikroskop skaningowy pozwala na ocenę jakości przygotowania powierzchni. RYS. 6 pokazuje przykładowe obróbki tkanek zęba wykonane dwoma metodami (tradycyjną - wiertłami oraz obróbką laserem). Widać wyraźnie różnicę w wyglądzie obu powierzchni. Powierzchnia po obróbce laserem (RYS. 6a) jest czysta i wyraźnie widać na niej obecność kanalików zębowych. Natomiast na powierzchni przygotowanej w sposób tradycyjny (RYS. 6b) nie widać kanalików ponieważ zostały zlepione tzw. warstwą mazistą tworzącą się podczas obróbki mechanicznej ubytka.

Szczególnym zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego jest określanie przyczyn zniszczenia implantów metalowych na podstawie obserwacji powstających przelomów tzw. fraktografia. Zagadnienie to od dawna znalazło zastosowanie w takiej dziedzinie techniki jak inżynieria materiałowa. Obserwując cechy przelomu, jak charakterystyczne pękania (kruchy, ciągliwy, międzykrystaliczny, transkrystaliczny itp.) miejsce jego rozpoczęcia, proponuje-



RYS. 5. Wypełnienie kanału zębowego ćwiekiem gutaperkowym z zastosowaniem pasty uszczelniającej: a) szczelina pomiędzy zębinią a pastą uszczelniającą, b) szczelina między ćwiekiem a pastą uszczelniającą.

FIG. 5. Endodontic filling of root canal by gutapercha and the sealer: a) The fissure between the dentin and the sealer, b) The fissure between the gutapercha point and the sealer.

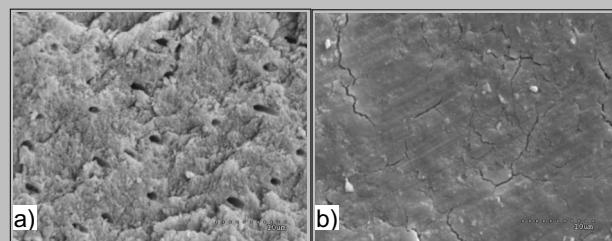
of magnifications. This methodology serves the possibility to assess as filling material quality as well the tooth conditioning technique. When Suliborski [8, 9] compared adhesion force between restorative material and the pre-processed tooth surface, he evaluated not only physical endurance, but observed in scanning electron microscope separation surfaces produced after longitudinal opposite direction force action. This examination revealed the places of rupture (tooth crack, restorative material crack, enamel crack or border among its). FIG. 4 presents the view tooth filling performed of different materials. There are clearly visible the difference between material. In FIG. 4a not only there is not lack of marginal leakage fissure, but moreover it is hardly to notice even the border line between filling material and the tooth. This is the evidence of the good material properties and proper hard tooth tissue defect conditioning. On the contrary in FIG. 4b the fissure is well visible, which can disqualify this filling material.

Moreover there is the opportunity to evaluate not only quality of the filling material, but additionally the separated components of the material. FIG. 5 shows series of fissures between root canal filling and dentine. The view of FIG. 5a presents the fissure course between dentine and sealer paste. FIG. 5b show the fissure between the sealer and gutapercha point. These data are important due to evaluation of used materials and the filling technique.

The proper tooth preparation is closely connected to marginal leakage. And once again help of scanning electron microscope is difficult to assess as over valuable. It is useful tool for evaluation of quality of surface preparation. FIG. 6 shows the examples of tooth hard tissues preparation. First by application of normal method: bur, and second by mean of laser light. The differences in appearance of the surfaces are well visualized

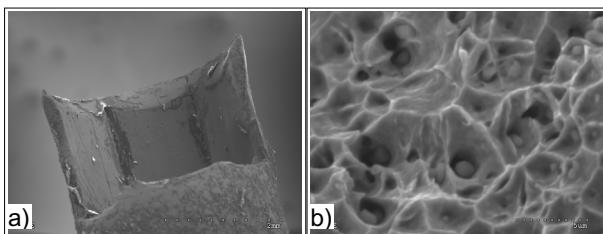
Laser prepared surface (FIG. 6a) is pure and the presence of dentine tubuli can be clearly observed. However, on the surface treated by the bur (FIG. 6b) these tubuli are invisible due to presence of smear layer which is produced during mechanical preparation of the dentine.

The especial application of scanning electron microscope is recognition of the metal dental implant destruction causes on the basis of fracture surface observation i.e. fractography. This methodology is well known in technical sciences - material engineering. The usually used methods for dental implant monitoring can be excellent supplemented by scanning electron microscope analysis to explain the origin of treatment failure. One can observe the fracture features: characteristic cracks (brittle, ductile, intercrystalline, transcrystalline etc.), site of its origin, propagation and then can describe the cause of the fracture, as well can decide if fixture destruction was caused by material malformations, breaking the endurance limit, over tension, not proper con-



RYS. 6. Ząb obrabiany różnymi technikami: a) Powierzchnia obrabiana laserem, b) Powierzchnia obrabiana tradycyjnie - wiertłem.

FIG. 6. Hard tooth tissues prepared in different techniques: a) Laser treated surface, b) Bur (old technique) treated surface.



RYS. 7. Zniszczony implant: a) widok ogólny, b) powiększenie fragmentu przełomu.

FIG. 7. The fractured titanic fixture: a) General view, b) Close-up of fracture surface.

gację pęknięcia możemy określić przyczynę jego powstania a tym samym określić, czy zniszczenie implantu powstało w skutek wad materiałowych, przekroczenia dopuszczalnych naprężeń, niewłaściwej konstrukcji lub technologii wykonania implantu, niewłaściwego zamocowania itp. Znalezienie przyczyny zniszczenia pozwala na dobór materiałów i technologii wykonania pozwalający w przyszłości na uniknięcie uszkodzeń implantów. Przykładowe fotografie zniszczonego AlphaBio (średnica 3,75 mm, długość 10 mm) implantu przedstawiono na RYS. 7.

Rozwój nowych materiałów przeznaczonych dla chirurgii jamy ustnej jest znacząco wspierany przez badania w SEM. Określenie wyłącznie metod wytwarzania i cech fizycznych nie wystarcza aby przejść od konstruowania do oceny *in vivo* nowych materiałów dla sterowanej regeneracji tkanek ang. guide tissue regeneration, GTR [10, 11.]. Ocena cech powierzchni jest kluczową w projektowaniu membran i określaniu jej zastosowań klinicznych. Najważniejszym dla techniki chirurgicznej w GBR jest stworzenie barier dla nablonka i nieosteogennej tkanki łącznej. Pierwszych z tych celów można osiągnąć dzięki kontrolowanym nierównościami powierzchni (szorstkość, strefy okluzyjne), zaś drugi dzięki fizykochemicznym cechom materiału membrany. Ponadto, gładka powierzchnia jest najlepszą dla kontaktu z kością pacjenta i zapewnia adaptację oraz przyleganie.

Wnioski

1. Obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym pozwalają otrzymać dane, które nie byłyby możliwe do uzyskania dotychczas stosowanymi metodami (np. szerokość szczelin, ich charakter, miejsca występowania itp.)
 2. Analiza obrazów otrzymanych z elektronowego mikroskopu skaningowego pozwala w wielu przypadkach na przewidywanie zachowania się materiału i tego konsekwencje oraz właściwe jego zaprojektowanie.
 3. Badanie w elektronowym mikroskopie skaningowym są cennym uzupełnieniem dotychczas stosowanych metod.

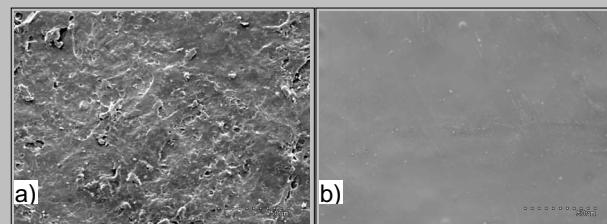


FIG. 8. Nowa dwuwarstwowa membrana barierowa przeznaczona dla sterowanej regeneracji kości: a) powierzchnia chitosanowa (szorstka) - powinna być zwrócona do podłożą kostnego aby stworzyć warunki do przyspieszenia osteogenezy, b) powierzchnia metylocelulozowa (gładka) - dla zatrzymania migracji tkanek miękkich

FIG. 8. The new bilayer membrane for guided tissue regeneration, magnification 600x: a) chitosan surface (rough) - should be faced to bone defect to accelerate the osteogenesis, b) methylcellulose surface (glossy) - for soft tissue occlusion.

struction or production technology of the implant and last improper insertion the fixture in to the alveolar bone. When one finds the reason of the fracture then it will make possible to choose the correct material and the technology o production which omitted the above mention failure. Exemplification images of the fractures screw AlphaBio dental implant (diameter 3.75 mm, length 10 mm) are shown at the FIG. 7.

Development of new materials for oral and maxillofacial surgery has to be supported by scanning electron microscope examination. The presentation only production method and physical features is not sufficient to pass from production to in vivo evaluation of the novel materials for guide tissue regeneration, GTR [10, 11]. Evaluation of membrane surface pattern is essential to design and decide the clinical application. The most important at GTR surgical technique is establish the barrier for epithelium and not-osteogenic connective tissue. First aim is reached thanks to roughness of the membrane surface, and the second due to physico-chemical features of the membrane material. Moreover, glossy surface is highly recommended to contact to the bone, to reach the proper adaptation and adhesion.

Conclusions

1. The observations in scanning electron microscope present the data which never be obtained by visualization methods previously used (i.e. width of fissures, its features, locations, ect.)
 2. The prediction of the material behaviour and its consequences as well its proper design are possible in many cases thanks to scanning electron microscope image analysis.
 3. The examination in scanning electron microscope is worthwhile supplement of the previously applied methods.

- [1] Newbury D.E., Joy D.C., Fiori C.E., Goldstein J.I. Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis Plenum Press New York and London (1986),
- [2] Sokołowski J. "Czynniki wpływające na wytrzymałość połączenia metalowych elementów retencyjnych szyn i mostów AET z materiałami żywiczymi" Praca doktorska Instytut Stomatologii Akademii Medycznej w Łodzi. Łódź (1989).
- [3] Livaditis G. J., Thompson V. P. "Etched casting: and improved retentive mechanism for resin bonded retainers" *J. Prosth. Dent.* 47, (1982), 52.
- [4] Banaszek K. "Postępowanie endodontyczno-chirurgiczne warunkujące szczelność okolicy przywierzchołkowej korzenia zęba" Praca doktorska Akademia Medyczna Łódź (1999),
- [5] Banaszek K., Pawlicka H., Klimek L.: "Super - EBA as a retrograde filling material after apicectomy - a SEM study". International Conference Material Engineering - New materials and Technology applied in Automotive industry and Biomaterials Liberec 4th - 6th June 2001, s. 5, CD Paper 2.
- [6] Banaszek K., Pawlicka H., Klimek L.: "Evaluation of root-end filling materials" The 10th Biennial Congress European Society of Endodontontology Munich Germany 4?6 October, R 36, (2001).

References

- [7] Suliborski St. "Wpływ obróbki strumieniowo-ściernej na połączenia odtwórczych materiałów adhezyjnych z tkankami zęba" *Protetyka Stomatologiczna* XXXIV, 4 (1984), s. 215-222.
- [8] Suliborski St., Sokołowski J. "Wpływ preparatu DENTIN ADHESIT na połączenie cementu fosforanowego i polikarboksylowego oraz żywicy MF HELIOSIT z zębina" *Protetyka Stomatologiczna* XXXVII, 2 (1987), s. 95-101.
- [9] Kozakiewicz M.: Charakterystyka przygotowania obrazów i ocena wyników ich subtrakcji wykonanej z zastosowaniem cyfrowego analizatora obrazu własnego projektu. *Magazyn Stomatologiczny*, 4 (116), (2001), 32-39.
- [10] Kozakiewicz M., Bodek K. H.: Membrana polimerczanowo-chitosanowa do sterowanej regeneracji tkanek. *Magazyn Stomatologiczny*, 111, 11, (2000), 10-12.
- [11] Kozakiewicz M., Bodek K. H.: New barrier membrane for GBR composed of chitosan and methylcellulose Assessment in vivo. *J. Cran. Maxillofac Surg.*, vol. 30, suppl. 1, p. 179.

MODYFIKACJE POWIERZCHNI IMPLANTÓW METALICZNYCH

IWONA PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ*,**, WIESŁAWA OKRÓJ*, **
BOGDAN WALKOWIAK*,***,***

*CENTRUM DOSKONAŁOŚCI NANODIAM, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ

**ZAKŁAD BIOFIZYKI, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ W ŁODZI

***ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

Streszczenie

Implanty medyczne powinny spełniać wiele istotnych warunków, aby mogły być bezpiecznie stosowane u osób chorych. Od wszczepów wymaga się braku toksyczności i cech alergennych oraz braku działań mutagennych i kancerogennych. W zależności od zastosowań wymagania poszerzają się o hemostazę i trombozgodność oraz biofunkcjonalność. Wszystkie implanty z czasem ulegają degradacji. W przypadku implantów metalicznych znaczącym zjawiskiem jest korozja, która może prowadzić do metalozy oraz do utraty ich właściwości mechanicznych. Metalami najczęściej stosowanymi w medycynie jest tytan i jego stopy, stopy Co-Cr-Mo oraz stal medyczna 316L. Materiały te cechują dobre właściwości mechaniczne i fizyko-chemiczne. Tolerancja przez organizm biorcy jest zróżnicowana. Poprawa biozgodności i tolerancji materiału może być osiągnięta drogą modyfikacji jego powierzchni. Rodzaje zmian powierzchni wszczepów metalicznych można najogólniej podzielić na dwie grupy: fizyko-chemiczną i biochemicalną. Metody fizyko-chemiczne powodują zmiany składu chemicznego istniejącej powierzchni. Metody biochemicalne oparte są na przyłączaniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie białek do powierzchni "utrzymującą" warstwę wierzchnią wszczepu.

SURFACE MODIFICATIONS OF METALLIC IMPLANTS

IWONA PRZYBYSZEWSKA-DOROŚ*,**, WIESŁAWA OKRÓJ*, **
BOGDAN WALKOWIAK*,***,***

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

**DIVISION BIOPHYSICS INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ

***DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ

Abstract

Medical implants should meet several relevant conditions for safely use. Grafts have to be free from toxicity and allergenic features, and also free from mutagenic and carcinogenic effects. In dependence on the use requirements can be extended on hemo- and thrombo-compatibility, and also on bio-functionality. Every implant undergo to gradual degradation due to contact with body fluids. Corrosion is a significant phenomenon in the case of metallic implants, and it can results in metalosis and also in lose of mechanical property of an implant. The most often used metallic materials are: titanium and its alloys, Co-Cr-Mo alloys and medical steel 316L. These materials possess proper mechanical and physico-chemical properties, but their tolerance by the recipient body is diverse. An improvement in biocompatibility and tolerance of metallic materials can be reached by a surface modification. Types of surface modification methods can be divided onto two groups: physico-chemical and biochemical methods. Physico-chemical methods of modification cause changes in chemical composition of the existing surface, whereas biochemical methods rely on attachment of small organic molecules, which allow to bind to the surface of specific proteins, making the implant surface more attractive.

Wstęp

Historia stosowania implantów sięga wielu tysięcy lat, kiedy to w Ameryce Centralnej Majowie uzupełniali braki w uzębieniu specjalnie do tego celu wybranymi muszlami [1]. Pierwsza publikacja na temat stosowania implantów pochodzi z 1565 roku, kiedy to Petronius pisał o używaniu złotych płyt do korekcji wad podniebienia. W XVII wieku Fabritius stosował druty wykonane z żelaza, miedzi i brązu do łączenia kości [2]. W 1804 roku Bell użył igły ze złota i srebra oraz płytki z aluminium i mosiądzu [1].

W XX wieku pojawiły się nowe tworzywa metaliczne. W 1920 roku w USA, dla potrzeb medycznych opracowano stop kobaltowo-chromowo-molibdenowy o nazwie Vitallium. W czasie II wojny światowej zaczęto interesować się tytanem, ale dopiero po 1940 roku wdrożono go i jego stopy do medycyny. W latach 1972-74 w Stanach Zjednoczonych opracowano i opatentowano skład stali medycznej AISI 316L, szeroko stosowanej w implantologii [2].

Powszechnie używana definicja biomateriału to: materiał naturalny lub wytworzony przez człowieka, który umieszczony całkowicie lub częściowo w żywej strukturze lub w zastosowaniach biomedycznych spełnia, podtrzymuje lub zastępuje funkcję naturalną" [3].

Norma Unii Europejskiej definiuje implanty jako: "wyroby medyczne kontaktujące się z tkanką miękką/kością (w tym z płynami śródtkankowymi) (...) oraz z krwią" [4].

Mianem wyrobu medycznego określa się: "każdy materiał, instrument, aparat, urządzenie lub inny artykuł, (...) wyłącznie lub głównie w celu diagnozowania, (...) leczenia (...) w stanie chorobowym (...) bądź w przypadku urazu, (...) a także zastępowania lub modyfikacji anatomii albo procesu fizjologicznego" [4].

Ze względu na to, że implanty pozostają w kontakcie z różnego typu tkankami i płynami ustrojowymi, muszą spełnić wiele rygorystycznych warunków. Jedną z ważniejszych cech jest biozgodność, określana jako zdolność materiału do właściwego funkcjonowania, z jednoczesnym brakiem negatywnego wpływu na organizm biorcy [5]. Niemniej istotną cechą jest biofunkcjonalność, polegająca na wypełnianiu zaplanowanych funkcji *in vivo* przez zakładany czas, a także odporność na korozję, zużycie ściernie i jednorodność. Do tej pory nie udało się wytworzyć biomateriału, który całkowicie spełniałby wszystkie wyżej wymienione funkcje. Typową, niekorzystną reakcją organizmu na źle dobrany materiał jest otaczanie implantu tkanką włóknistą i tworzenie swoistej "kapsuły", w celu wykluczenia biomateriału z kontaktu z tkanką [6]. Dla skutecznego stosowania implantów ortopedycznych i stomatologicznych niezbędne jest uzyskanie zespolenia powierzchni materiału z tkanką kostną [7]. Wszystkie biomateriały ulegają degradacji, przez którą rozumie się przekształcenie materiału w mniej złożone produkty przejściowe lub końcowe. Istotne jest, aby produkty degradacji nie wywoływały negatywnych skutków, takich jak efekty toksyczne, mutagenne, kancerogenne, stany zapalne, oraz by istniała możliwość szybkiego usunięcia ich z organizmu [8].

Implanty metaliczne podlegają procesom korozji zachodzącym pod wpływem płynów ustrojowych. Biokorozję mogą wywoływać również naprężenia istniejące w metalu lub powstające pod działaniem sił zewnętrznych. Produkty korozji mogą utworzyć warstwę przylegającą do powierzchni metalu i w ten sposób zabezpieczać metal przed dalszymniszczeniem [9].

Introduction

The history of implants reaches many thousand years ago, when Central American Mayas were filling up the losses in dentition with especially chosen shells [1]. First official publication concerning the implants application is originated in 1565, when Petronius wrote about the application of golden plates in purpose of the palate defects correction. In XVII century Fabritius was using the wires made of iron, copper and bronze to connect the bones [2]. In 1804 Bell applied golden and silver needles and also aluminium and brass plates [1].

The brand new metallic materials appeared in the XX century. In 1920 in the USA a new alloy consisting of cobalt-chromium-molybdenum was designed. Its name was Vitallium. During the 2nd World War titanium was in the centre of interest, but finally titanium alloys and titanium itself were implemented to medicine after 1940. In the years of 1972-74 the widely known and applied in implantology medical steel AISI 316L was designed and implemented [2].

Commonly used definition of biomaterial is expressed as following: "material which is natural or designed by man, being placed completely or partially in living structure or biomedical application fulfills, sustains or substitutes the natural function" [3].

European Union Norm defines the implants as: "medical devices that contact with tissue / bone (including body fluids) (...) and blood" [4].

The medical products is defined as: "any material, instrument, apparatus, equipment or any other article (...) solely or principally for the purpose of diagnosis (...), treatment (...) of disease (...) or in the case of injury (...), and replacement or modification the anatomy or of physiological process" [4].

Taking into consideration the fact that implants remain in contact with various kinds of tissues and body fluids they have to meet many rigorous conditions. One of the most important features is its bio-compatibility, defined as ability of given material for a proper functioning with simultaneous lack of negative influence on recipient organism [5]. The not less important feature is bio-functionality, consisting of planned functions' performance *in vivo* during assumed time, and finally the corrosion resistance, abrasive wear and homogeneity. So far it was impossible to create such a material that would completely fulfil all above mentioned conditions and functions. Typical undesirable organism reaction for not-properly chosen biomaterial is surrounding the implant with fibrous tissue and creating a kind of "capsule" to exclude the given biomaterial from organism and any contact with tissue [6]. To effectively use orthopedical and dental implants the materials and osseous tissues surface combination is necessary [7]. All biomaterials are subjected to degradation. It is understood that material transforms into less complex transition or final products. It is important to assure that degradation products will not cause any negative effects (like toxic effects, mutation, cancer, inflammation) and that there is a possibility of fast removing of the implant from an organism [8].

The metallic implants are subjected to corrosion processes being the consequence of body fluids influence. Bio-corrosion can be also caused by the stresses existing in the metal or forming under influence of external forces. The corrosion products can create the layer adhering to the metal surface. Such the layer can protect metal from subsequent

Metalem powszechnie akceptowanym do produkcji implantów jest tytan i jego stopy. Tytan jest wysoce odporny na korozję dzięki cienkiej i stabilnej powierzchniowej warstwie tlenkowej. Jednak warstwa ta może ulec zniszczeniu, co w konsekwencji wywołuje gwałtowne uwalnianie jonów tytanu, które dyfundują do otaczających tkanek i mogą być wraz z krwią transportowane do odległych tkanek [10].

Modyfikacja powierzchniowa jako metoda poprawiająca właściwości implantu

Biozgodność wszczepu zależy od fizycznej struktury materiału i jego własności fizykochemicznych w obszarze wzajemnego oddziaływanego z układem biologicznym [11]. W celu poprawy biotolerancji, odporności korozyjnej i odporności na zużycie ścierne, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnych cech biomateriałów, dokonuje się zmian w obrębie warstwy wierzchniej implantu [6].

Modyfikowane powierzchnie wszczepów metalicznych powinny być:

- jednorodne,
- o odpowiedniej adhezji dającej wysoką odporność na delaminację warstwy,
- wytrzymałe i funkcjonalne,
- jak najcieńsze, aby nie zmieniały parametrów geometrycznych i mechanicznych całego implantu,
- wytrzymałe na sterylizację [5].

Wszystkie rodzaje modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można podzielić na dwie grupy:

- fizyko-chemiczne, czyli takie które powodują zamierzoną zmianę składu chemicznego na istniejącej powierzchni oraz takie, które zmieniają właściwości fizyczne tj. mikrostrukturę, topografię powierzchni, odporność korozyjną i odporność na zużycie przez tarcie;
- biochemicalne, oparte są na wytwarzaniu lub przyłączaniu związków organicznych, które ułatwiają wiązanie biologicznie aktywnych makrocząsteczek do powierzchni [5].

Modyfikacja powierzchni implantów metalicznych może być wykonywana różnymi metodami, a każda z nich daje nieco inne właściwości powierzchni. Do zastosowań ortopedycznych i stomatologicznych modyfikuje się powierzchnię celem uzyskania odpowiedniego stopnia jej porowatości. Tkanka kostna z łatwością przerasta powłoki chropowate, co zapewnia trwałe połączenie implantu z otaczającą tkanką. Wyniki badań in vitro wskazują na pozytywne związki między chropowatością powierzchni i wiązaniem komórek, aktywacją osteoblastów, syntezą kolagenu i dojrzewaniem chondrocytów [12]. Natomiast w przypadku kontaktu implantu z krwią wymaga się jak najmniejszego stopnia chropowatości jego powierzchni. Mikrowglębenia na powierzchni są szybko wypełniane przez komórki krwi [13].

Najprostszą modyfikacją powierzchni metalicznych jest szlifowanie materiałem ściernym o różnym stopniu ziarnistości. Pozwala ono na różnicowanie stopnia chropowatości powierzchni. Z powodu wprowadzonych przez materiał ścierny zanieczyszczeń wymagane są dalsze obróbki powierzchni.

Obróbką taką jest między innymi polerowanie elektrolityczne, które jest procesem anodowego roztwarzania metali. Przyłożone napięcie powoduje, że zasadnicza część ładunku elektrycznego gromadzi się na punktach wznieśień chropowatości powierzchni, które dzięki temu są intensywnie roztwarzane i niwelowane [6]. Polerowanie elektrolityczne pozwala uzyskać powierzchnie całkowicie wolne od deformacji bez naruszenia budowy sieci krystalicznej. Stopień wygładzenia jest tym większy, im struktura i skład chemicz-

destruction [9].

The commonly production-accepted metal is titanium and its alloys. Titanium is highly corrosion resistant due to a thin and stable layer of oxides. However such the layer can be destroyed and in consequence allows to rapid titanium ions release. Such ions can diffuse into surrounding tissues and can be transported with blood to distant tissues [10].

Surface modification as a method improving an implant characteristics

Biocompatibility of implant depends on materials physical structure and its physical and chemical properties in the region of interactions with biological system [11]. Certain changes in the region of implant surface layer are implemented to improve the biotolerance, corrosion resistance and abrasive wear resistance with simultaneous keeping advantageous of biomaterials features [6].

Modified metallic implant surfaces should be:

- homogenous
- with appropriate adhesion, which should give high surface delamination resistance
- durable and functional
- as thinnest as possible to assure that whole implant's geometrical and mechanical parameters are unchanged
- sterilization process resistant

All kinds of metallic implant surface modifications can be divided into following groups:

- physico-chemical - these are the modifications that make intentional chemical configuration changes at the existing surface and such that change the physical properties (microstructure, surface topography, corrosion resistance and abrasive wear resistance)
- biochemical - these modifications base on organic compounds' creation or addition, that facilitate the surface binding of biologically active macromolecules.

The metallic implant surface modification can be performed with various methods. Each of these give slightly different results. In a case of orthopaedic and dental applications the surface is modified in such a way that its porosity is sufficiently high. The osseous tissue binding to a rough surface assures the fixed connection between implant and surrounding tissue. The in vitro examinations show that there are positive relations between roughness of surface and cells binding, activation of osteoblasts, collagen synthesis and cartilage growing [12]. However in the case of implant contact with blood the implant porosity has to be as small as possible. All (even the smallest) pores on the implant's surface are almost immediately filled with blood cells [13].

The easiest modification of metallic implants surface is grinding with different degree of granularity of abrasive material. It allows to diversify the grade of surface roughness. Further treatment is needed since the abrasive material introduces impurities.

The electrolytic polishing is such a treatment. This process is the anodic metal pulping. Applying the voltage causes the effect, that essential part of the electric charge gathers in the points of elevations. Such points are intensively levelled and pulped due to this process [6]. Electrolytic polishing allows to get the surfaces completely free of deformations and without breaking of the crystal structure. The grade of smoothing is the greater if the structure and chemical composition are more homogeneous [2]. The sandblasting process is widely used during production of dental and orthopaedic implants [14]. The corundum grains used in this method allow to both clean of the surface and to get its

ny stopu są bardziej jednorodne [2].

Przy wytwarzaniu implantów stomatologicznych i ortopedycznych często stosuje się piaskowanie (sandblasting)[14]. Wykorzystywane w tej metodzie ziarna korundu pozwolą zarówno oczyścić, jak i uzyskać odpowiednią chropowatość powierzchni metalu, co sprzyja osadzaniu się komórek na powierzchni implantu. Uderzenie ziaren korundu o powierzchnię metalu przekazuje jej odpowiednią energię kinetyczną. Energia ta jest częściowo absorbowana przez sieć krystaliczną implantu powodując powierzchniowe topnienie materiału oraz liczne defekty sieci krystalicznej. Wielkość obszaru topnienia i liczba defektów sieci krystalicznej implantu zależy od właściwości podłoża i energii kinetycznej ziaren korundu.

Czyste ziarna korundu są również dodawane do wodnej zawiesiny dwutlenku tytanu lub hydroksyapatytu (HA). Utworzona w ten sposób mieszanina zostaje poddana suszeniu, a następnie spiekaniu. Tak przygotowanymi ziarnami, których rdzeniem jest korund, modyfikuje się powierzchnię implantu w procesie piaskowania. Warstwy TiO_2 lub HA charakteryzują się dobrą adhezją do powierzchni metalu i nie ulegają zmianom pod wpływem sonikowania, czy też czyszczania w roztworze alkoholu. Metoda piaskowania pozwala uzyskać powierzchnię implantu o średnim stopniu chropowatości w granicach $Ra = 10-15 \mu\text{m}$. Na powierzchnię metalu może być również nakładana nierozpuszczalna warstwa krzemowo-ceramiczna. Modyfikowane w ten sposób powierzchnie przyspieszają odnowę tkanki kostnej [14]. Metoda ta, w połączeniu z innymi technikami modyfikacji powierzchni, takimi jak trawienie kwasami, pozwala uzyskać poprawę integracji implantu z kością. Maksymalne wiązanie z kością obserwuje się dla implantów poddanych procesowi piaskowania częsteczkami TiO_2 o wielkości ziaren w zakresie $180-220 \mu\text{m}$ [12].

Dość popularnym procesem modyfikacji powierzchni tytanu i jego stopów jest hydrotermiczna zmiana powierzchni tytanu poprzez zanurzenie w wodnym roztworze CaO z jednoczesnym ogrzewaniem. Wysokie wartości pH, ciśnienia i temperatury roztworu przyczyniają się do zwiększenia grubości warstwy modyfikowanej powierzchni i wzmagają syntezę tytanianu wapnia na tytanie i jego stopach. Na takiej powierzchni zachodzi zwiększone wytrącanie się apatytu. Dużą zaletą powierzchni poddanej hydrotermicznej obróbce jest jej sterylność, nieodzowna dla wszczępu przed operacją. W metodzie tej dzięki możliwości doboru różnych temperatur i ciśnień, możliwe jest tworzenie różnych mikrostruktur implantu [15].

Prostą metodą chemiczną, dzięki której można indukować bioaktywność tytanu i jego stopów, jest obróbka w wodnym roztworze 10 M NaOH , zakończona ogrzewaniem.

W procesie na powierzchni czystego tytanu i jego stopów $Ti-6Al-4V$, $Ti-6Al-2Nb-Ta$, czy $Ti-15Mo-5Zr-3Al$ tworzy się cienka warstwa tytanianu sodu. Na tak przygotowanej powierzchni materiału, w środowisku sztucznego płynu ustrojowego SBF (simulated body fluid) tworzy się gęsta i jednorodna warstwa apatytu. Zmodyfikowana powierzchnia metalu ułatwia łączenie żywnej kości z warstwą apatytu. Podczas obróbki cieplnej warstwa hydrożelu jest odwodniona i przekształcona do trwałej postaci amorficznej lub krystalicznej. Możliwość kontrolowania takiej modyfikacji powierzchni może okazać się korzystna w zahamowaniu heterogenicznego zarodkowania warstwy wierzchniej. Daje to pozytywne rokowanie w obszarze badań nad zastawką serca i patologicznego zwapienia, gdzie proces mineralizacji nie jest pożądany [16, 17]. Do modyfikacji powierzchni biomateriałów można również zastosować roztwory kwasów. Zanurzając tytan lub jego stopy w kwasie można nadać obrabianej powierzchni specjalne własności elektryczne,

appropriate roughness. This favours the cells settling on the implant surface. The corundum grains that are stroking the metal surface transfer to it an adequate kinetic energy. This energy is partially absorbed by metal crystal net causing the local surface melting and numerous crystal structure defects. The area of melting and the number of crystal structure defects depends on the properties of base and the kinetic energy of corundum grains.

Clean corundum grains are also added to the water suspension of titanium dioxide or hydroxyapatite (HA). The mixture created in this way is subjected to drying and then sintering. Such the grains, which core is corundum, modify the surface of implant during sandblasting process. The layers of TiO_2 and HA indicate good adhesion to the metal surface and sonication process or during cleaning in alcohol solution do not change the properties. The sandblasting method allows also to obtain implant surface with medium level of roughness within the range of $Ra = 10-15 \mu\text{m}$. The insoluble ceramic-silicon layer can also be applied on the implants surface. The surface modified in this way accelerates the osseous tissue renewal process [14]. This method, combined with other surface modification techniques (such as acids etching), allows to obtain considerable improvement of implant and bone integration. The maximal setting with bone are observed in the case of implants being subjected to sandblasting process with TiO_2 molecules, and size of the used molecules is within a range of $180-220 \mu\text{m}$ [12].

The modification process of titanium and its alloys surface called hydrothermal surface modification is also quite popular. It is performed by immersion in a water solution of CaO and simultaneous heating. The solution high pH, pressure and temperature values are causing the increase of modified layer thickness. It also intensifies the calcium titanate synthesis on the titanium and its alloys. At such the surface increased precipitation of apatite occurs. An advantage of surface being subjected to hydrothermal treatment is its sterility which is necessary before implantation. Wide range of temperatures and pressures in this method allow to create different microstructures at implant surface [15].

A treatment in 10 M NaOH water solution finished with heating is a simple chemical method allowing to induce the bioactivity of titanium and its alloys. During this process on the surface of titanium and its alloys ($Ti-6Al-4V$, $Ti-6Al-2Nb-Ta$ or $Ti-15Mo-5Zr-3Al$) thin layer of sodium titanate is created. At such the material surface, in the presence of simulated body fluids (SBF), the dense and homogenous apatite layer is created. Modified metals surface facilitates the connection of living bone tissue with apatite layer. During the heat treatment the layer of hydrogel is dehydrated and transformed to a stable amorphous or crystal form. A possibility of control of such the surface modification can be advantageous in an inhibition of top surface heterogeneous nucleation. It gives a positive prognosis in the scope of cardiac valve studies and pathological calcinosis, where the mineralization process is not desirable [16, 17].

Acid solutions can also be used in the biomaterials surface modification process. During the process of immersing of titanium or its alloys in the acid solutions special electric, optic or biochemical properties can be set [18]. The samples of titanium modified with fosfonian acid (eg. Metylodiphosphonic (MDP), propylo-1,1,3,3-tetraphosphonic (PTP) and etylo-1,1,2-triphosphonic (ETP) acids) allow for good proliferation of osteoblasts [19]. It has been observed, that a total number of proteins is much higher at the ETP treated surface than at non-modified versions. Functional groups of these acids improve the cellular adhesion, growth of osseous tissue and connection between implants and bones [19, 20]. The covalent bonds created be-

optyczne i/lub biochemiczne [18]. Próbki tytanu modyfikowane kwasami fosfoniowymi, (np. kwas metyłodifosfonowy (MDP), kwas propilo-1,1,3,3-tetrafosfonowy (PTP) i kwas etylo-1,1,2-trifosfonowy (ETP)) pozwalają na dobrą proliferację osteoblastów [19]. Stwierdzono, że całkowita ilość białek jest znacznie wyższa na tytanie modyfikowanym ETP, niż na niemodyfikowanych jego powierzchniach. Grupy funkcyjne tych kwasów poprawiają adhezję komórkową, wzrost i tworzenie się tkanki kostnej oraz połączenie między implantem i kością [19, 20]. Wiązania kowalencyjne powstałe pomiędzy cząsteczkami kwasu fosfoniowego i powierzchnią tytanu mogą w ten sposób tworzyć rusztowania (scaffolds) dla nowo tworzącej się kości, prowadząc ostatecznie do połączenia implantu z tkanką [19].

Bardzo trwałą warstwę fosforanu na tytanie można uzyskać poprzez obróbkę termiczną. Polega ona na uzyskaniu proszku hydroksyapatytowego (HA) na drodze reakcji wytrącenia z roztworu, związków $\text{Ca}(\text{NaO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Wyprążony w piecu próżniowym proszek HA, po uwodnieniu wodą destylowaną, tworzy pastę, w której umieszcza się tytanowe detale. Po naniesieniu pasty, detale te poddaje się suszeniu i obróbce cieplnej. Metoda ta pozwala otrzymać cienką, trwałą fizycznie porowaną warstwę HA. Przestrzeń między porami zwiększa się wraz ze wzrostem ziaren proporcjonalnie do wzrostu temperatury [20].

Warstwa fosforanu wapnia zarodkuje i wzrasta na tytanie z wodnego roztworu poprzez proces powierzchniowo indukowanej mineralizacji fosforanu wapnia (SIM - surface induced mineralization). Proces ten różni się od konwencjonalnych metod wytrącania warstw hydroksyapatytu niską temperaturą obróbki, a także tworzeniem jednorodnych warstw na powierzchniach o złożonych kształtach, jak również na mikroporowatościach powierzchni. Dzięki niskiej temperaturze, możliwe jest sterowanie przemianami fazowymi i procesem krystalizacji. Proces ten może mieć duże znaczenie dla obszaru badań w zakresie patologicznego wapnienia sztucznej zastawki, gdzie proces mineralizacji *in vivo* nie jest pożądany. Wstępne wyniki badań pokazują, że tak powstałe warstwy są trwałe, a tempo tworzenia kości jest szybsze, niż na warstwach uzyskanych metodą natryskiwania plazmowego [21].

Duże nadzieje w inżynierii powierzchni wiąże się z metodą wykorzystującą zjawisko ablacji laserowej, która w nomenklaturze międzynarodowej została nazwana metodą osadzania laserem impulsowym PLD-Pulsed Laser Deposition. Polega ona na tym, że silnie zogniskowana, impulsowa wiązka laserowa pada na kolejne miejsca odparowywanego materiału (tarczy). Pochłonięta energia wiązki laserowej powoduje wzbudzenie atomów tarczy, w miejscu padania plamki laserowej, prowadząc do ablacji. Następnie zachodzi oddziaływanie pomiędzy promieniowaniem laserowym, a odparowanym materiałem, którego efektem jest wzrost energii i rozproszenie odparowanego materiału, a potem osadzenie go na modyfikowanym podłożu. Techniką PLD można osadzać monowarstwy lub wielowarstwy różnego rodzaju: tlenków, azotków, węglków, borków i innych, lub ich kompozycji. Powłoki uzyskane tą metodą charakteryzują się dobrą adhezją, jednorodnością i nanokryształcząną strukturą. Możliwe jest otrzymanie cienkich warstw fulerenowych w powłokach węglowych, powłok organicznych składających się z przewodzących polimerów, powłok diamentowych, czy też warstw hydroksyapatytowych [22]. Właściwości promieniowania laserowego pozwalają również na tworzenie i modelowanie rys o głębokości kilku mikrometrów. Hallgren i współpracownicy [23] dokonali modyfikacji powierzchni nośnej gwintu śruby tytanowej, wykorzystując wiązkę laserową o długości fali 532 nm i częstotliwość 10 Hz, emitowaną przez laser neodymowy. Światło la-

tween phosphonic acid molecules and titanium surface can build, in this way, the scaffolds for newly growing bone, finally leading to connection of implant and tissue [19].

The thermal treatment can create highly resistant layer on the titanium surface. It bases on the gathering of the hydroxyapatite powder (HA) on the way of precipitation reaction from the solution of $\text{Ca}(\text{NaO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. The HA powder, being roasted in the vacuum furnace after being hydrated with distilled water, create the paste which is located on the titanium details. After this process the details are subjected to drying and heat treatment. This method allows to get thin and physically resistant rough HA layer. The space among the pores is increased together with increase of grain size and temperature level (20).

The calcium phosphate nucleates and grows on the titanium from a water solution through the surface induced mineralisation (SIM). This process is different than conventional methods of hydroxyapatite layers precipitation due to low treatment temperature and creating the uniform layers on the surfaces with complex shapes and also with surface micro-porosities. Thanks to low temperature there is possibility for control of the transformation phase and crystallisation process. This process can be important for studies in the scope of artificial heart valve calcinosis, where the process of mineralisation *in vivo* is completely undesirable. Preliminary studies show that such the created layers are stable and the rate of bone creating is faster than in the case of layers being created in the way of plasma spraying [21].

High hopes are connected with the method using the phenomenon of laser ablation, which is named PLD-Method (Pulsed Laser Deposition). Strongly focused impulse laser beam falls on vaporised metal (the shield). The absorption of laser beam causes induction of shield atoms leading to an ablation. Then the reaction between the laser beam and a vaporised metal occurs. It results in increase of vaporized metal energy and further diffuse. Finally the matter is set on the modified surface. The monolayers or multilayers of different kinds (oxides, nitrides, carbides, borides and others and their compositions) can be embedded with PLD method. Layers get with this method are characterised with goods adhesion, homogeneity and nanocrystalline structure. It is also possible to get thin fullerene layers in the carbon coatings, organic coatings consisting of conductive polymers, diamond or hydroxyapatite layers [22]. The laser radiation properties also allow to create and modelling of scratches with depth of a few micrometers. Hallgren and co-workers [23] modified the bearing surface of titanium screw thread using the 532 nm and 10 Hz neodymium laser beam. The laser beam passed through the quartz plate is deflected and then focused on the thread surface in the form of 290 light spots. These spots are penetrating the material for a depth of 30 μm and created the craters of 10 μm diameter. Such pits allow to be penetrated by osseous tissues and bones creating cells. During the process of ablation the heat is transported through the layer of titanium oxide. In the consequence large tensions are formed in the proximity of craters that can cause micro-breaks among them. This method is used for micro-modelling the threads of dental and orthopaedic implants with complex shapes [23].

With sol-gel method there is possibility to produce inorganic layers, such as glasses and ceramics, on the surface of metallic implants [24]. With this method there are spread layers with one or more components. This technology allows to control the roughness of layer and presence of hydroxyl groups. To improve the properties of HA layers put on the metallic biomaterial, as first the silica layer is embedded, and then the calcium phosphate [6]. The study carried by Michalik and co-workers [25] presents that the ad-

sera przepuszczane przez płytę kwarcową zostaje ugięte, a następnie skupione na powierzchni gwintu w postaci 290 plamek świetlnych. Plamki te penetrują materiał na głębokość 30 μm i tworzą kratery o średnicy 10 mm. Utworzone wgłębienia pozwalają na penetrację przez komórki kościotwórcze. Podczas procesu ablacji ciepło jest transportowane w warstwie tlenku tytanu. W rezultacie powstają duże naprężenia termiczne, które mogą powodować pęknięcia wokół kraterów. Metoda ta służy do mikromodelowania gwintów implantów stomatologicznych i ortopedycznych o złożonych kształtach [23].

Metodą zol-gel można wytwarzać warstwy nieorganiczne, takie jak szkła i ceramiki na powierzchni wszczepów metalicznych [24]. Metodą tą nanoszone są najczęściej powłoki tlenkowe jedno- i wieloskładnikowe. Technologia ta pozwala na sterowanie porowatością warstwy obecnością grup hydroksylowych. W celu poprawy właściwości warstw HA nanoszonych na biomateriał metaliczny, jako pierwszą nanosi się warstwę krzemionki, a następnie warstwę fosforanu wapnia [6]. Badania przeprowadzone przez Michalika i współpracowników [25] wykazują, że przyczepność powłok HA do podłoża tytanowego jest wyższa, niż badane porównawczo powłoki diamentopodobne. Powłoki HA na podłożu tytanowym otrzymane metodą zol-gel, są powłokami a charakterze dyfuzyjnym. Dość istotna jest możliwość uzyskania warstw HA o działaniu bakteriobójczym zawierających jony srebra, miedzi i cynku [6]. Uzyskane warstwy zapewniają ochronę przed korozją oraz są odporne na ścieranie [24].

Nanoszenie powłok na wszczepy może odbywać się również na drodze elektroforezy [26]. Dzięki odpychaniu się jednakowo naładowanych cząsteczek nie dochodzi do koagulacji i aglomeracji. Metodę elektroforetyczną stosuje się do nanoszenia warstw hydroksyapatytowych z różnego rodzaju zawiesin wodnych. Uzyskane tą metodą warstwy wykazują obniżoną przyczepność do podłoża. Poprawę adhezji można uzyskać poprzez elektroforetyczne nanoszenie powłoki hydroksyapatytowej na wcześniej naniesioną warstwę krzemionki. Zaletą tej metody jest możliwość uzyskania jednorodnej warstwy na wyprofilowanej powierzchni oraz wąski zakres temperatur procesu [6].

Duże znaczenie w modyfikacji powierzchni metalicznych mają chemiczne CVD - Chemical Vapour Deposition oraz fizyczne PVD - Physical Vapour Deposition metody nanoszenia warstw z fazy gazowej [24]. Brak jednolitego nazewnictwa oraz duża różnorodność metod PVD powodują, że często te same metody nazywane są przez autorów różnie [33]. Pomimo różnorodności metod, tylko niektóre z nich znalazły zastosowanie do powierzchniowych obróbek implantów. Wykorzystuje się je głównie do wytwarzania twardej i odpornych na ścieranie oraz korozję powłok węglików, azotków, a także tlenków metali na podłożach stopek metalicznych. Dzięki metodzie RF CVD - Radio Frequency CVD możliwe jest wytworzenie warstw diamentopodobnych DLC (Diamond Like Carbon) oraz warstw nanokrystalicznego diamentu NCD (Nanocrystalline Diamond) [27], które charakteryzują się wysoką biotolerancją [28]. Warstwa węglowa powstała w metodzie RF CVD, poprzez rozkład węglowodorów, ma grubość od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów, jest amorficzna lub nanokrystaliczna. Warstwa węglowa przechodzi w sposób płynny w przejściową dyfuzyjną warstwę węglików metalu, a następnie w podłoż. Taka struktura zapewnia dużą twardość, bardzo dobrą adhezję do podłożu i wysoką odporność korozyjną [29]. Czasami, w celu poprawy adhezji warstwy węglowej do podłożu nanosi się pośrednią amorficzną powłokę silikonową [30]. Warstwy mogą być wykorzystywane do pokrywania implantów stomatologicznych, ortopedycznych i narę-

hesion of HA layers to ground is higher than in the case of examined diamond-like layers. The HA layers got on the titanium surface with Sol-Gel method have a diffusive character. Quite important fact is the one, that there is possibility to obtain the bactericidal layers containing silver, copper and zinc ions [6]. The layers obtained are corrosion and abrasion resistant [24].

The layers spread on the implants can be also performed on the way of electrophoresis [26]. Due to electrostatic repulsion of the same charged particles there is no threat of coagulation and agglomeration. The electrophoretic method is used in the case of hydroxyapatite layers formation with different kinds of water suspensions. But layers obtained in this way are characterised with reduced base adhesion. An improvement of adhesion can be obtained by electrophoresis layer embedding on the previously obtained layer of silica. The advantage of this method is the narrow scope of temperatures and possibility of embedding the homogenous layer on the profiled surface [6].

Chemical Vapour Deposition (CVD) and Physical Vapour Deposition (PVD) methods, embedding the layers from the gas phase, have a large importance in the metallic surfaces modification [24]. A lack of unified name system and the large number of various PVD methods cause that many authors call it in the different way [33]. Apart of this variety, only some of them found its usage in the processes of surface treatment of implants. These are used mainly during the production of hard, abrasive and corrosion resistant layers of carbides, nitrides and metallic oxides on the metallic alloys base. Thanks to RF CVD (Radio Frequency CVD) method there is possibility to create diamond-like layers (DLC - Diamond Like Carbon) and layers of nanocrystalline diamond (NCD - Nanocrystalline Diamond) [27], which are characterised with high bio-tolerance [28]. The carbon layer created in the RF CVD method, by the decomposition of hydrocarbons, has the thickness of a few to tens of nanometers and is amorphic or nanocrystalline. The carbon layer transforms smoothly to transitional diffusive layer of metal carbides, and then into a base metal. Such the structure assures high toughness, very good base adhesion and also high corrosion resistance [29]. Sometimes, to improve the carbon layer adhesion to the base, the amorphic silicon layer is embedded [30]. Layers can be used to cover the dental and orthopaedic implants and surgical equipment. The layer of amorphic or crystalline carbon can be also created with the MW CVD (Micro Wave CVD) method and with the method that uses a hot filament (HF CVD) [2]. With PA CVD method (Plasma Assisted CVD) there is possibility to obtain the layer of TiO_2 on the 316L steel surface. Such a surface can improve the steel corrosion resistance [31].

Plasma Spraying method is also the method of surface modification. Plasma is produced in the burner under the influence of electrical arc created between central tungsten electrode and anode - copper nozzle cooled with water. The coating material is fed in the form of powder directly to a burner by which gas is blown through. This gas transforms into a plasma form (the temperature is in the range of 10^4 °C). With this method there is possibility to get the HA layers with the nano- and poly-crystalline structure [32]. Moreover it is possible to get the layers with Al_2O_3 , ZrO_2 and pure titanium with this method. [6]. The cohesion forces and the phenomenon of molecules jamming have the influence on the layer adhesion. Taking into consideration all above, it is important to adequately prepare the surface (cleaning from oxides and fats) before plasma spray treatment. The layer adhesion can be also improved by increase of base surface roughness [33].

The glowing methods are also the part of plasma meth-

dzi chirurgicznych. Warstwę krystalicznego lub amorficznego węgla można również uzyskać metodą mikrofalowego wzbudzania plazmy niskociśnieniowej (MW CVD) oraz metodą z zastosowaniem gorącego włókna (HF CVD) [2]. Metodą PA CVD - Plasma Assisted CVD można otrzymać warstwę TiO_2 na powierzchni stali 316L. Warstwa taka przyczynia się do podwyższenia odporności korozjowej stali [31].

Technologią modyfikacji warstwy wierzchniej jest także metoda natryskiwania plazmowego (Plasma Spraying). Plazma powstaje w palniku, pod wpływem łuku elektrycznego wytwarzanego pomiędzy centralnie umieszczoną elektrodą wolframową i anodą - miedzianą dyszą chłodzoną wodą. Materiał powłoki podawany jest w postaci proszku do palnika, przez który przedmuchiwany jest gaz przechodzący w stan plazmy (temperatura rzędu 10 000°C). Metodą natryskiwania plazmowego można uzyskać warstwy HA o strukturze nano- i polikrystalicznej [32]. Ponadto tą metodą można również uzyskać warstwy z Al_2O_3 , ZrO_2 , oraz z czystego tytanu [6]. Na przyczepność powłoki do podłożu mają wpływ głównie zjawiska zakleszczania się cząsteczek i siły kohezji. Z tego powodu, przed natryskiwaniem plazmowym należy odpowiednio oczyścić powierzchnię z tłuszczu oraz z tlenków. Przyczepność powłok do podłożu można zwiększyć poprzez zwiększenie chropowatości powierzchni podłożu [33].

Do grupy technik plazmowych zalicza się także metody jarzeniowe, wykorzystujące wyładowanie jarzeniowe zachodzące w mieszaninie gazowej w zakresie ciśnień 10⁻³-13 hPa. Używa się w nich zjonizowanego gazu o dużej koncentracji naładowanych cząsteczek, uzyskanego w wyniku przepływu prądu elektrycznego w gazach. Plazma wykorzystywana w technikach jarzeniowych ma charakter niskotemperaturowy, nierównowagowy i nieizotermiczny na skutek ciągłego pobierania energii z pola elektrycznego. Do wytwarzania warstw wykorzystuje się wyładowanie jarzeniowe anormalne, tzn. takie w którym bierze udział powierzchnia całej katody. Wyładowanie jarzeniowe jest źródłem energii cieplnej, które wspomaga i przyspiesza procesy chemiczne i fizyczne zachodzące na granicy faz implant-gaz reaktywny. W piecach jarzeniowych katodą jest wsad, a anodą zimne ściany pieca. W obszarze katodowego spadku potencjału zachodzi dysocjacja cząsteczek gazu i jego jonizacja. W polu elektrycznym dodatnie jony azotu zdają się ku katodzie, przy której ulegają znacznemu przyspieszeniu, zderzając się z nią i oddając jej część swej energii kinetycznej, co z kolei prowadzi do nagrzewania wsadu i częściowego rozpylania jego powierzchni. Katoda ogrzewana dodatkowo promieniowaniem cieplnym pochodzącym z przykatodowych obszarów wyładowań, adsorbuje atomy gazu, które dyfundują w jej głąb i tworzą związki chemiczne ze składnikami wsadu [33].

Azotowanie i utlenianie jarzeniowe umożliwia wytworzenie warstw typu $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ oraz TiO_2 na stopie tytanu OT-4-0 (0.4-1.4% Al; 0.5-1.3% Mn; 0.3% Fe; 0.12% Si; Ti-reszta). Grubości tych warstw wynoszą odpowiednio 35-40 μm i 60 nm. Badania przeprowadzone przez Czarnowską i współpracowników pokazują, że warstwy te charakteryzują się dużą biozgodnością w odniesieniu do ludzkich fibroblastów [34]. Użycie węglowodorów w technikach jarzeniowych pozwala na wytworzenie warstw węglika tytanu lub warstw węglowych [33,35]. Wierzchoń i współpracownicy, w procesie węgloazotowania w warunkach wyładowania jarzeniowego, uzyskali dyfuzyjną warstwę $Ti(CN)+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ na stopie tytanu Ti-1Al-1Mn. Powłoki uzyskane na drodze azotowania i węgloazotowania jarzeniowego stanowią barierę przed zajściem zjawiska metalozy, charakteryzują się dobrą odpornością na korozję i na zużycie przez tarcie. W przeprowadzonych badaniach *in vivo* zaobserwowano wy-

ods. These methods use the glow discharges occurring in the gas mixture in the pressure range 10-3-13 hPa. Ionised gas used in this method, has high concentration of charged particles obtained by current flowthrough the gas. As a consequence of constant power absorption form the electric field, the plasma used in the glowing techniques has a low-temperature character, is non-balanced and not isothermal. During production of surface layer the abnormal discharges is used (i.e. full cathode surface takes part). The glow discharge is the source of heat energy which aids and speeds up the chemical and physical processes taking place in the phases boundary: implant - reactive gas. In the glowing furnaces - the cathode is a sample and anode - cold furnace walls. In the area of cathode potential fall there is dissociation of gas particles and ionisation. In the electric field positive nitrogen ions are heading to the cathode, are rapidly accelerated at the cathode region, and then hitting the cathode. As a consequence they pass part of their kinetic energy to it, what leads to heating the sample and partial atomisation of its surface. The cathode, additionally heated with heating radiation, absorbs the gas atoms which diffuse into the cathode, and make chemical compounds with sample components [33].

Nitriding and oxidizing under glow discharge allows to create the $TiN+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ layers and TiO_2 on the titanium alloy OT-4-0 (0,4-1,4% Al; 0,5-1,3% Mn; 0,3%Fe; 0,12% Si; Ti- the rest). The thickness of these layers is 35-40μm and 60μm, respectively. The research lead by Czarnowska and co-workers shows that the layers are characterised with big biocompatibility in relation to human fibroblasts [34]. The use of hydrocarbons in the glowing techniques allows for production of carbide layers, titanium carbide or carbon layers [33,35]. Wierzchoń and co-workers got the $Ti(CN)+Ti_2N+\alpha Ti(N)$ diffusive layer on the Ti-1Al-1Mn base, in the process using carbonitride in the conditions of glowing discharge. The layers got in the way of nitriding and carbonitriding glowing are the barrier against the metalose phenomenon, and are characterised by good corrosion resistance and abrasive wear. In *in vivo* experiments following was observed: high degree of cells proliferation, smaller thickness of bags developed around the implant and not noticed presence of implant components around. All above is the evidence of layer good biocompatibility [36]. The glowing techniques are used for cleaning, activating and modifying the biomaterials and implants surfaces. The advantage of these methods is possibility of controlling the technological parameters what allows to shape the microstructure and topography of surface. Additionally it allows to control the chemical and phase composition of surfaces being produced. The glowing nitriding process allows also to create outer layer on the elements built of titanium alloys with complicated shapes [34, 35].

The ions implantation is the outer layer treatment based on built-in other atoms in solid body as a consequence of gathering adequate kinetic energy in a strong electric field (ranged from several keV to several MeV). An ion, in the first stage of its movement, causes ionisation of the base and then the exchange of electrons between ion and base atoms. In the final stage of an ion movement, the collisions are of the elastic character [33]. The energy of bombarding ions should be chosen in this way, that the implantation process should be predominant to the ion etching process [27]. The elements the most often used are carbon, nitrogen and silicon [6]. The ions implantation allows to improve the surface toughness and decrease friction coefficient on the basis of changes in the crystal net in the region being located just under the surface [4]. Additionally the ions implantation increases the surface corrosion resistance with

soką proliferację komórek, mniejszą grubość torebek wytworzonych wokół wszczępu oraz nie stwierdzono obecności składników stopu w otaczających tkankach, co świadczy o biozgodności tych warstw [36]. Techniki jarzeniowe są stosowane do oczyszczania, uaktywnienia i modyfikacji biomateriałów oraz powierzchni implantów. Zaletą tych metod jest możliwość kontrolowania parametrów technologicznych co pozwala kształtać mikrostrukturę i topografię powierzchni, a także skład chemiczny i fazowy wytworzonych powierzchni. Proces azotowania jarzeniowego pozwala na wytworzenie wierzchniej warstwy na elementach ze stopów tytanu o złożonych kształtach [34, 35].

Implantacja jonów jest obróbką warstwy wierzchniej, polegającą na wbudowywaniu obcych atomów w ciało stałe, na skutek nabycia przez nie odpowiedniej energii kinetycznej uzyskanej w silnym polu elektrycznym (od kilku keV do kilku MeV). Jon w pierwszym etapie swojego ruchu powoduje jonizację podłoża i dochodzi do wymiany elektronów między jonom a atomami podłoża. W końcowym etapie ruchu jona w ciele stałym, zderzenia mają charakter sprężysty [33]. Energia jonów bombardujących powierzchnię powinna być tak dobrana, aby proces implantacji przeważał nad procesem trawienia jonowego [27]. Pierwiastkami najczęściej stosowanymi w celu poprawy właściwości użytkowych implantów są: węgiel, azot i krzem [6]. Implantacja jonów pozwala na poprawę twardości powierzchni i zmniejszenie współczynnika tarcia na skutek zmian w sieci kryształicznej w obszarze położonym tuż pod powierzchnią [4]. Ponadto implantacja jonów zwiększa odporność powierzchni na korozję przy niewielkim zużyciu materiału ochronnego i stosunkowo krótkim czasie obróbki [37]. Krupa i współpracownicy, na podstawie wyników przeprowadzonych badań stwierdzają, że implantacja jonami azotu powierzchni stopu tytanu OT-4-0 poprawia jego odporność korozyjną. Najlepszą odporność na korozję obserwuje się dla warstw wytworzonych przy strumieniu $1 \times 10^{17} \text{ N} \cdot \text{cm}^{-2}$. Jeżeli nanokryształiczne wtrącenia TiN utworzone podczas implantacji są koherentne (spójne) ze strukturą podłoża tytanowego i jednorodnie rozproszone po całej powierzchni, to proces implantacji jest najkorzystniejszy, a wzrost odporności korozycznej jest największy [38]. W zastosowaniach medycznych implantacja jonów ma zastosowanie w produkcji endoprotez stawu biodrowego, gdzie obserwuje się nawet kilkudziesięciokrotny wzrost żywotności stawu, wykluczając potrzebę ponownej wymiany protezy po jej zużyciu [6].

Przyłączanie związków aktywnych biologicznie jest szeroko stosowaną metodą poprawy właściwości biomateriałów, dzięki której możliwa jest kontrola odpowiedzi na kontakt komórek i tkanek. We wczesnych pracach częstym obiektem badań były podłoża polimerowe, ze względu na obecność na ich powierzchniach grup funkcyjnych, umożliwiających łatwe przyłączanie związków organicznych. Natomiast metale lub ich stopy nie posiadają takich właściwości.

Najprostszą metodą modyfikacji powierzchni metalicznych jest ich pasywacja, skutkująca powstawaniem tlenków, które dość łatwo adsorbowują cząsteczki wody, co prowadzi do powstawania grup hydroksylowych. Możliwe jest również odkładanie białek drogą prostej fizycznej adsorpcji, ale wiązania takie są stosunkowo słabe [39]. Silanizacja była dość długo rozpatrywana jako wzorcowa metoda dla przyłączania związków organicznych do powierzchni TiO_2 , $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ lub Co-Cr-Mo [40, 41], ale niestety jest to proces mało wydajny, bo ograniczony przez niewielką liczbę grup hydroksylowych. Za pomocą spektroskopii fotoelektronów stwierdzono, że tylko ok. 15% tlenu na powierzchni przyłącza jon wodorowy [42]. Wiele uwagi poświęca się formowaniu na powierzchni tytanu warstw tlenkowych oraz grup hydroksylowych, które spełniają dużą rolę w tworzeniu po-

small protective material consumption and relatively short treatment time [37]. Krupa and co-workers claims (on the basis of their studies) that nitrogen ions implantation of OT-4-0 titanium surface improves its corrosion resistance. The best corrosion resistance was observed for layers created with $1 \times 10^{17} \text{ N} \cdot \text{cm}^{-2}$. If TiN nanocrystalline inclusions, created during implantation, are coherent with titanium base structure and homogenously scattered over whole surface, then the implantation process is the most profitable and the increase of corrosion resistance is the biggest [38]. In medical applications, the ions implantation is used in production of endo-hip joint prosthesis, where the life time of implant is tens percent longer, eliminating the need of exchanging the prosthesis after its use [6].

The attachment of biologically active compounds is widely used method for improving of biomaterials properties which allow to control of cells and tissue response to contact with implant surface. The early works was focused on polymer materials due to presence at the polymer surface of functional groups. These groups allowed for easy attach organic compounds. The metals and their alloys do not posses such properties. The easiest way to modify the metallic surface is its passivation causing creation of oxides easily absorbing molecules molecules of water. This, in turn, leads to creation of hydroxide groups. There is also possibility to accumulate of proteins by a simple physical absorption, however these bonds are relatively weak [39]. Silanisation for a long time was considered as a model-method for attachment of organic compounds to surfaces of TiO_2 , $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ or Co-Cr-Mo [41]. Unfortunately this process was of low efficiency since it was limited by low quantity of hydroxide groups. Using the photo-electrons spectroscope it was found that only 15% of surface oxygen atoms were connected with hydrogen ions. A plenty of attention was focused on the formation of oxides layers and hydroxyl groups, which create organo-metallic surface on titanium. Production of such surfaces is performed at high temperatures with use of oxygen and water. High content of OH groups is closely related to stabilisation of organic compounds on the implant surface, and the method allows to get maximal OH groups quantity at temperature of 550K [42].

Peptides having the Arg-Gly-Asp (RGD) sequence are the most important in modification of metallic implants. Such the sequence is placed in a large number of adhesive proteins and components of extracellular matrix [44,45]. It mediates adhesion of many kinds of cells. There are trials of control of interaction between cell and biomaterial by attaching growth factors to an implant surface. However, when RGD peptides mediate early cells adhesion, released growth factors can modulate other cells functions: proliferation, differentiation and activity on the biomaterial surface [46].

Schwartz and co-workers proposed surface modification of $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ alloy that causes significant increase in number of hydroxyl groups. It has been observed that heating of thin layer of phosphoric acid on the alloy surface gives adhered and slightly rough layer of $\text{Ti}(\text{H}_3\text{PO}_4)_3$ -TiP. TiP has a layer structure with a large number of OH groups laying at different levels. Further stage of the modification is silanisation with use of aminopropyltriethoxysilane and binding of proteins having the RGD sequence. This way prepared surface causes an increase in osteoblasts activity [47].

There is possibility of binding of hydroxyl or amine groups by plasma polymerisation [56] of allylic acid or allyl amines on the surface of $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, respectively. The next step is immobilisation of active proteins, e.g.: morphogenic bone protein (BMP-4), which possess high osteoinductive activity [44], and is capable to induce the osteoblastic response in cells different than bone-making.

Nanci and co-workers [49] prepared a surface titanium

wierzchni organometalicznych. Wytwarzanie takich powierzchni dokonuje się w wysokich temperaturach przy użyciu tlenu i wody. Duża zawartość grup OH jest ściśle związana ze stabilizacją związków organicznych na powierzchni implantu. Metoda ta pozwala uzyskać maksymalną ilość grup OH w temperaturze 550K [42].

Na szczególną uwagę w modyfikacji implantów metalicznych zasługują peptydy zawierające sekwencję Arg-Gly-Asp (RGD) [43]. Sekwencja taka występuje w wielu białkach adhezywnych oraz składnikach macierzy pozakomórkowej [44,45]. Pośredniczą one w adhezji wielu typów komórek. Czynione są również próby kontroli interakcji komórka-biomateriał poprzez przyłączanie do powierzchni czynników wzrostu. Jednak gdy peptydy zawierające RGD jako pierwsze pośredniczą w adhezji komórek do podłożu, a wtedy uwalniane czynniki wzrostu mogą moduluować późniejsze funkcje komórek, takie jak: proliferacja, różnicowanie i aktywność na powierzchni biomateriału [46].

Schwartz i współpracownicy zaproponowali modyfikację powierzchni stopu Ti6Al4V, która pociąga za sobą znaczny wzrost liczby grup hydroksylowych. Stwierdzono, że ogrzewanie cienkiej warstwy kwasu fosforowego na powierzchni stopu daje zaadherowaną i nieco chropowatą warstwę $Ti(H_3PO_4)_3$ -TiP. TiP posiada budowę warstwową o dużej zawartości grup OH leżących na różnych poziomach. Kolejny etap takiej modyfikacji to silanizacja z użyciem aminopropylo(triethoxy) silanu i wiązanie białek zawierających sekwencję RGD. Tak przygotowana powierzchnia powoduje wzrost aktywności osteoblastów [47].

Istnieje możliwość wiązania grup hydroksylowych lub aminowych metodą polimeryzacji plazmowej [56] odpowiednio kwasu allylowego lub amin allylowych na powierzchni stopu tytanu Ti6Al4V. Następny etap to immobilizacja aktywnych białek, np. białka morfogenetycznego kości (BMP-4), które posiada wysoką aktywność osteoindukcyjną [44] i jest zdolne do indukowania odpowiedzi osteoblastycznej w komórkach innych niż kościotwórcze.

Nanci i współpracownicy [49] opracowali metodę modyfikacji powierzchni tytanu umożliwiającą kowalencyjne wiązanie cząsteczek. Metal jest w pierwszym etapie traktowany mieszaniną kwasu siarkowego i nadtlenku wodoru, by spowodować wytworzenie warstwy TiO_2 na jego powierzchni. Następnie do warstwy tlenków przyłącza się aminoalkilosilany pośredniczące w wiązaniu wybranych biomateriałów.

Do modyfikacji powierzchni implantów użyto również fosfolipidów [50]. Kompleksem wapń-fosfolipid-fosforan ($Ca\text{-PL-PO}_4$) pokryto powierzchnię tytanu. Jednak spośród wielu badanych fosfolipidów tylko w przypadku fosfatydylseryny zaobserwowano podwyższoną aktywność osteoblastów i indukowanie osteogenezy [50].

Inną metodą modyfikacji powierzchni tytanu jest wiązanie kolagenu. Technika ta polega na tworzeniu, techniką plazmową, cienkiej warstwy propylenu, wszechepieniu kwasu akrylowego, a następnie przyłączeniu kolagenu. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że tak zmodyfikowana powierzchnia jest aktywna biologicznie i nie jest cytotsyczna [51].

Puleo i Mikulec przeprowadzili próby skuteczności modyfikacji powierzchni stopów Co-Cr-Mo i Ti6Al4V przy użyciu różnych metod przyłączania grup funkcyjnych. Zasada reakcji polegała na łączeniu grup hydroksylowych powierzchni stopów ze związkami aktywującymi, spośród których jedynie p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate) okazał się skuteczny. Trwałość połączenia OH-pNPC potwierdzono oceniąc ilość związanego z powierzchnią trypsyny [39, 52].

Zupełnie nowe możliwości daje synteza grup funkcyjnych na powierzchni implantu pokrytego warstwą amorficznego lub nanokrystalicznego węgla. Możliwe jest kontrolo-

modification method allowing for covalent attachment of molecules. In the first step, titanium is treated with mixture of sulphuric acid and hydrogen peroxide to create of TiO_2 layer. Then aminoalkilosilans, mediating of binding of chosen molecules, are attached to the layer of oxides. The phospholipides were also used to modify the implants surface [50]. The surface of titanium was covered with calcium-phospholipide-phosphate ($Ca\text{-PL-PO}_4$) complex. However among many phospholipides being examined only phosphatydylserine caused an increase in osteoblasts activity and induction of osteogenesis was observed [50].

Binding of collagen is another method of titanium surface modification. This technique bases on creation of thin layer of propylene, implantation of acrylic acid and then collagen attachment. *In vivo* tests showed that the modified surface is biologically active and is not cytotoxic [51].

Puelo and Mikulec performed tests of modification efficiency of Co-Cr-Mo and Ti6Al4V alloys surface with use of different methods for functional groups attachment. The reaction based on binding of hydroxyl groups at the alloy surface with activating compounds. Only p-NPC (p-nitrophenyl chloroformate) was effective. Durability of OH-pNPC connection was confirmed by estimation of quantity of trypsin attached to the surface [39, 52].

The functional groups synthesis on the implant surface coated with layer of amorphous or nanocrystalline carbon gives completely new possibilities. The controlled introduction of carboxyl groups via chemical synthesis [53,54,55] or plasma synthesis [4,56] is possible. Such the modification combines very profitable properties of carbon coating of metallic material with desired presence of given molecules at implant surfaces.

The most common techniques of metallic implants surface modification have been presented in this thesis. These methods were divided into physico-chemical and biological techniques, but modification methods can also be divided from the point of view of expected type of implant surface. For example HA layer can be achieved with sandblasting method, NaOH treatment, thermal treatment, PLD, Sol-Gel, electrophoretic and plasma spraying methods. Consecutively, carbon layers creation is possible in the way of PLD, RF CVD, MW PCVD or glowing methods, whereas TiN or TiCN layers can be produced via glowing or ions implantation methods.

Summary

The ideal biomaterial obtaining idea meeting all conditions of total organism tolerance with simultaneous high functionality is today very unreachable. The source of such state is not the matter of today's technology level but it is caused by strongly diversified requirements depending on the purpose of implant. The implant working with blood should be prepared in the different way than the implant dedicated to work with osseous tissue. It seems that such actions targeting on dedicated effects are purposeful. Methods presented in above mentioned review are fulfilling the purposeful metallic implants' surface modification requirements. These methods are becoming more and more wide known in the medical applications. All kinds of modifications are heading to significant improvement of implants' biocompatibility and biofunctionallity. It has to be also stressed that nowadays used technologies of surface modification are not increasing the costs of production of prostheses, thanks to using already known methods of metallic implant production.

wane wprowadzenie grup karboksylowych drogą syntezy chemicznej [53, 54, 55] lub plazmowej [4, 56]. Modyfikacja taka łączy w sobie bardzo korzystne cechy węglowego pokrycia podłożu metalicznego z pożądaną obecnością określonych cząsteczek na powierzchni implantu.

W pracy przedstawiono najczęściej stosowane techniki modyfikacji powierzchni implantów metalicznych, które podzielono na fizykochemiczne i biologiczne. Podziału metod modyfikacji powierzchni implantów metalicznych można dokonać również ze względu na oczekiwany typ warstwy wierzchniej wszczepu. Przykładowo warstwę HA można uzyskać metodą piaskowania, obróbkę w wodnym roztworze NaOH, obróbkę termiczną, metodę osadzania laserem impulsowym-PLD, metodę zol-gel, technikę elektroforetyczną oraz metodę natryskiwanie plazmowego. Z kolei wytwarzanie powłok węglowych możliwe jest na drodze PLD, RF CVD, MW PCVD lub metodą jarzeniową, natomiast warstwy azotowe mogą być wytwarzane metodą jarzeniową lub implantacji jonów.

Podsumowanie

Idea uzyskania idealnego biomateriału, spełniającego wszystkie wymagania pełnej tolerancji przez organizm przy jednoczesnej wysokiej funkcjonalności, wydaje się dziś bardzo odległa. Przyczyna takiego stanu rzeczy nie wynika z obecnego poziomu technologicznego, a spowodowana jest silnie zróżnicowanymi wymaganiami w zależności od przeznaczenia implantu. Inaczej musi być przygotowany implant przeznaczony do kontaktu z krwią, a inaczej przeznaczony do integracji z tkanką kostną. Wydaje się, że celowym jest takie postępowanie, które pozwala dokonać modyfikacji powierzchniowej implantu w ten sposób, aby uzyskać zamierzone efekty. Przedstawione w powyższym przeglądzie metody coraz lepiej spełniają wymogi celowej modyfikacji powierzchni implantów metalicznych i znajdują coraz szersze zastosowanie w praktyce medycznej. Wszelkiego rodzaju modyfikacje zmierzają w kierunku znaczącego poprawienia biozgodności i biofunkcjonalności implantu. Należy również podkreślić, że obecnie stosowane technologie modyfikacji powierzchniowej, dzięki wykorzystaniu istniejących już technologii wytwarzania implantu metalowego, nie podnoszą w zasadniczy sposób kosztu przygotowania protetyz.

Podziękowania

Praca była finansowana przez PBZ-KBN-082/T08/2002

Acknowledgements

This work was supported by PBZ - KBN - 082/T08/2002

Piśmiennictwo

References

- [1] Brzeziński J.: Historia Medycyny. PZWL Poznań 1990.
- [2] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [3] Chu P.K., Chen I.Y., Wang L.P., Huang N.: Plasma surface modification of biomaterials. Mater. Sci. Eng R, 36, 2002, 143-206.
- [4] Polska Norma PN-EN ISO 10993-1: Biologiczna ocena wyrobów medycznych.
- [5] Ratner B.D., Hoffman A.S., Schoen F.J., Lemons J.E.: An Introduction to Materials in Medicine. Academic Press 1996.
- [6] Łaskawiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.
- [7] Aselme K.: Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21, 2000, 667-681.
- [8] Enderle J., Blanchard S., J. Bronzino: Introduction to Biomedical Engineering. Academic Press 1999.
- [9] Jaruga Z., Nowakowska M.B: Chemia ogólna; Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 1990.
- [10] Blumenthal N.C, Cosma V.: Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions. J Biomed Mater Res 23 (A1suppl.), 1989, 13-22.
- [11] Thull R.: Physicochemical principles of tissue material interactions. Biomol Eng 19, 2002, 43-50.
- [12] Ronold H.J., Ellingsen J.E.: Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. Biomaterials 23, 2002, 4211-4219.
- [13] Martini D., Fini M., Franchi M., Pasquale V.D., Bacchelli B., Gamberini M., Tinti A., Taddei P., Giavaresi G., Ottani V., Raspanti M., Guizzardi S., Ruggeri A.: Detachment of titanium and fluorohydroxyapatite particles in unloaded endosseous implants. Biomaterials 24, 2003, 1309-1316.
- [14] Gbureck U., Masten A., Probst J., Thull R.: Tribocochemical structuring and coating of implant metal surface with titanium oxide and hydroxyapatite layers. Mater. Sci. Eng C 23, 2003, 461-465.
- [15] Hamada K., Kon M., Hanawa T., Yokoyama K., Miyamoto Y., Asaoka K.: Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. Biomaterials 23, 2002, 2265-2272.
- [16] Kim H.M., Miyaji F., Kokubo T., Nakamura T.: Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. J Biomed Mater Res 32, 1996, 409-417.
- [17] Kokubo T., Kim H.M., Miyaji F., Takadama H., Miyazaki T.: Ceramic-metal and ceramic-polymer composites prepared by a biomimetic process. Composites 30 Part A 1999, 405-409.
- [18] Krasicka-Cydzik E.: Badania impedancyjne tytanu i jego stopów implantowych. Inż. Biomat. IV, 2001, 27-31.
- [19] Viorney C., Guenter H.L., Aronsson B.O., Pechy P., Descocts P.: Osteoblast culture on polished titanium disks modified with phosphonic acids. J Biomed Mater Res 62, 2002, 149-55.
- [20] Hwang K.E., Kim C.S.: Interface characteristics changed by heat treatment of Ti materials with hydroxyapatite. Mater. Sci. Eng C 23, 2003, 401-405.
- [21] Campbell A.A., Fryxell G.E., Linehan J.C., Graff G.L.: Surface-induced mineralization: A new method for producing calcium phosphatase coating. J Biomed Mater Res 32, 1996, 111-118.
- [22] Burakowski T., Major B.: Osadzanie laserem impulsowym PLD. Inż. Mater. XX, 1999, 339-343.
- [23] Hallgren C., Reimers H., Chakarov D., Gold J., Wennerberg A.: An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. Biomaterials 24, 2003, 701-710.
- [24] Gluszek J.: Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [25] Michalik R., Łaskawiec J., Klisch M.: Powłoki ochronne wytwarzane metodą zol-gel na implantach. Inż. Mater. XXIII, 2002, 372-375.

- [26] Klyszejko-Stefanowicz L.: Elektroforeza w nośnikach, w: Ćwiczenia z biochemii; Klyszejko-Stefanowicz L. (red.) Wydawnictwo PWN, Warszawa 1999.
- [27] Kula P.: Inżynieria warstwy wierzchniej. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000.
- [28] Bąkowicz K., Mitura S.: Biokompatibility of NCD. J Wide Bandgap Mater. 9, 2002, 261-272.
- [29] Mitura S., Niedzielski P., Jachowicz D., Louda P., Langer M., Marciniak J., Stanishevsky A., Tochitsky E., Couvrat P., Denis M., Lourdin P.: Influence of carbon origin on the properties important for biomedical application. Diamond Relat. Mater. 5, 1996, 1185-1188.
- [30] Chandra L., Clyne T.W., Allen M., Rushton N., Butter R., Lettington A.H.: The effect of biological fluids on the adhesion of diamond-like carbon films to metallic substrates. Diamond Relat. Mater. 4, 1995, 852-856.
- [31] Furman P., Głuszek J., Masalski J.: Struktura i właściwości elektrochemiczne warstwy TiO₂ otrzymanej metodą MOCVD. Materiały III Ogólnopolskiej Konferencji, Obróbka powierzchniowa, Częstochowa-Kule 1996, 229-233.
- [32] Łaskawiec J., Michalik R., Klisch M.: Właściwości użytkowe powłok hydroksyapatytowych na implantach z tytanu i jego stopów oraz ze stopów kobaltu. Inżynieria Materiałowa XXIII, 2002, 376-379.
- [33] Burakowski T., Rolinski E., Wierzchoń T., Inżynieria powierzchni metali. Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1992.
- [34] Czarnowska E., Wierzchoń T., Maranda-Niedbała A.: Properties of the surface layers on titanium alloy and their biocompatibility i in vitro tests. J Mater Process Technol 92-93, 1999, 190-194.
- [35] Aronson B.O., Lausmaa J., and Kasemo B.: Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials. J Biomed Mater Res 35, 1997, 49-73.
- [36] Maranda-Niedbała A., Wierzchoń T., Czarnowska E.: Structure and properties of the surface layers produced on Ti-Al-1Mn titanium alloy under glow discharge conditions. Inż. Biomater. V, 2001, 25-26.
- [37] Przybyłowicz K.: Metaloznawstwo. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2003.
- [38] Krupa D., Baszkiewicz J., Mizera J., Wierzchoń T., Barcz A., Fillit R.: Effect of nitrogen-ion implantation on the corrosion resistance of OT-4-0 titanium alloy in 0.9%NaCl environment. Surf Coat Technol 111, 1999, 86-91.
- [39] Puleo D.A.: Biochemical surface modification of Co-Cr-Mo. Biomaterials 17, 1996, 217-222.
- [40] Puleo D.A.: Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo. J Biomed Mater Res 29, 1995, 951-957.
- [41] Puleo D.A.: Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. J Biomed Mater Res 37, 1997, 222-228.
- [42] Lu G., Bernasek S.J., Schwartz J.: Oxidation of polycrystalline titanium surface by oxygen and water. Surface Science 458, 2000, 80-90.
- [43] Ferris D.M., Moodie G.D., Dimond P.M., Gioranni C.W.D., Ehrlich M.G., Valentini R.F.: RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. Biomaterials 20, 1999, 2323-2331.
- [44] Pierschbacher M.D., Ruoslahti E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309, 1984, 30-33.
- [45] Geissler V., Wolf C., Scharnweber D., Worck H., Wenzel P.: Collagen type I -coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblast. J Biomed Mater Res 51, 2000, 752-60.
- [46] Puleo D. A., Kissling R.A., Sheu M.S.: A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), on titanium alloy. Biomaterials 23, 2002, 2079-2087.
- [47] Schwartz J., Avaltroni M. J., Danahy M. P., Silverman B.M., Hanson E.L., Schwarzbauer J. E., Midwood K.S., Gawalt E. S.: Cell attachment and spreading on metal implant materials. Mater. Sci. Eng. C 23, 2003, 395-400.
- [48] Mora M., Cassinelli C.: Organic surface chemistry on titanium surface via thin film deposition. J Biomed Mater Res 37, 1997, 198-206.
- [49] Nanci A., Wuest J.D., Peru L., Brunet P., Sharma V., Zalzal S., McKee M.D.: Chemical modification of titanium surface for covalent attachment of biological molecules. J Biomed Mater Res 40, 1998, 324-335.
- [50] Satsangi A., Satsangi N., Glover R., Satsangi R. K., Ong J.L.: Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. Biomaterials 24, 2003, 4585-4589.
- [51] Morra M., Cassinelli C., Cascardo G., Cahalan P., Cahalan L., Fini M., Giardino R.: Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies. Biomaterials 24, 2003, 4639-4654.
- [52] Mikulec L.J., Puleo D.A.: Use of p-nitrophenyl chloroformate chemistry to immobilize protein on orthopedic biomaterials. J Biomed Mater Res 32, 1996, 203-208.
- [53] Ushizawa K., Sato Y., Mitsumori T., Machinami T., Ueda T., Ando T.: Covalent immobilization of DNA on diamond and its verification by diffuse reflectance infrared spectroscopy. Chem. Phys. Lett. 351, 2002, 105-108.
- [54] Ida S., Tsubota T., Hirabayashi O., Nagata M., Matsumoto Y., Fujishima A., Tsubota T., Hirabayashi O., Ida S., Nagaoka S., Nagata M., Matsumoto Y.: Chemical reaction of hydrogenated diamond surface with peroxide radical initiator. Phys. Chem. Chem. Phys. 4, 2002, 806-811.
- [55] Pirek M., Okrój W., Przybyszewska I., Jakubowski W., Walkowiak B., Chemiczna modyfikacja proszków diamentowych. Inż. Biomat. VII, 2004, 36-39.
- [56] Castaneda S.I., Espinoza V.A.A., Fiere F.L., Franceschini D.F., Jacobsohn L.G.: Surface modifications in diamond-like carbon films submitted to low-energy nitrogen ion bombardment, Nucl Instr and Meth B 175-177, 2001, 699-70.

ZMIANY POJEMNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ FIBROBLASTÓW PO KONTAKCIE Z WYBRANYMI BIOMATERIAŁAMI

JOANNA MAJAK*, WITOLD JAKUBOWSKI*, ANETA BALCERCZYK**,
PIOTR NIEDZIELSKI*, BOGDAN WALKOWIAK*,***

*CENTRUM DOSKOŃALOŚCI NANODIAM, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA

**ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ, INSTYTUT BIOFIZYKI, UNIWERSYTET ŁÓDZKI

***ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ I MEDYCZNEJ, UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI

Słowa kluczowe: fibroblasty, pojemność antyoksydacyjna, glutation, NCD, tytan, stres oksydacyjny
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 63-66]

Wprowadzenie

Ochrona przed reaktywnymi formami tlenu odgrywa kluczową rolę w fizjologii komórki. Osłabienie tej ochrony prowadzi do stresu oksydacyjnego, co można wykorzystać do oceny stanu fizjologicznego komórki. Zmiany poziomu aktywności antyoksydacyjnej obserwuje się w następstwie warunków niekorzystnych, a potencjalnie niezwiązanych z reakcjami wolnorodnikowymi, takich jak: szok cieplny, infekcje bakteryjne, działanie promieniowania UV [1-4]. Procesy biochemiczne, charakterystyczne dla odpowiedzi na warunki stresu, indukowane są także jako efekt kontaktu komórek z powierzchnią biomateriału. Fakt ten pozwala wykorzystywać obserwacje zmian aktywności antyoksydacyjnej do oceny biozgodności materiałów pozostających w kontakcie z komórkami [5, 6].

Cel pracy

Celem pracy było porównanie zmian w ochronie antyoksydacyjnej fibroblastów hodowanych w kontakcie z wybranymi biomateriałami.

Materiały i metody

Próbki wykonane ze stali medycznej (AISI 316L) i stopu tytanu (Ti6Al4V) były przygotowane przez polerowanie mechaniczne powierzchni, a następnie podlegały procesowi polerowania elektrochemicznego. Na część próbki została naniesiona warstwa nanokrystalicznego diamentu metodą RF CVPD [7].

Fibroblasty były hodowane w standardowych warunkach: 37°C, 5% CO₂ i 95% wilgotności. Próbki biomateriałów były umieszczane w naczyniu, zawierającym konfluente komórki, a parametry antyoksydacyjne (całkowita pojemność antyoksydacyjna, stężenie całkowitego glutationu oraz aktywność katalazy) były oceniane po 24 godzinach hodowli.

Komórki izolowano z podłożą hodowli przez trypsynizację. Następnie odwirowywano i zawieszano 2x10⁷ komórek

CHANGES IN AN ANTI-OXIDATIVE CAPACITY OF FIBROBLAST DUE TO A CONTACT WITH SELECTED BIOMATERIALS

...63...

JOANNA MAJAK*, WITOLD JAKUBOWSKI*, ANETA BALCERCZYK**,
PIOTR NIEDZIELSKI*, BOGDAN WALKOWIAK*,***

*CENTRE OF EXCELLENCE NANODIAM, INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOPHYSICS, UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

***DEPARTMENT OF MOLECULAR AND MEDICAL BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ, POLAND

Key words: fibroblasts, anti-oxidative capacity, glutathione, NCD, titanium, oxidative stress.

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 63-66]

Background

A defense from reactive oxygen species plays a key role in the cell physiology. Weakness of this protection leads to an oxidative stress, which can be used for estimation of physiological condition of cells. Changes in a level of anti-oxidative activity are observed as a result of stressful situations, for example: heat stress, bacterial infections, UV treatment [1-4]. Biochemical processes, typical for a response to stressful conditions, are also induced by cell contact with a biomaterial surface. This fact allows us to use of an anti-oxidative activity for estimation of a biocompatibility of material being in contact with cells [5, 6].

The aim

A comparison of a total anti-oxidative capacity, a level of glutathione concentration and an activity of catalase, in fibroblasts allowed for contact with selected biomaterials, were undertaken.

Materials and methods

Samples of stainless steel (AISI 316L) and titanium alloy (Ti6Al4V) were prepared by a lathe processing followed by a mechanical, and subsequently a chemical polishing. Some samples were then subjected to nanocrystalline diamond synthesis on the surface by the RF CVPD method [7].

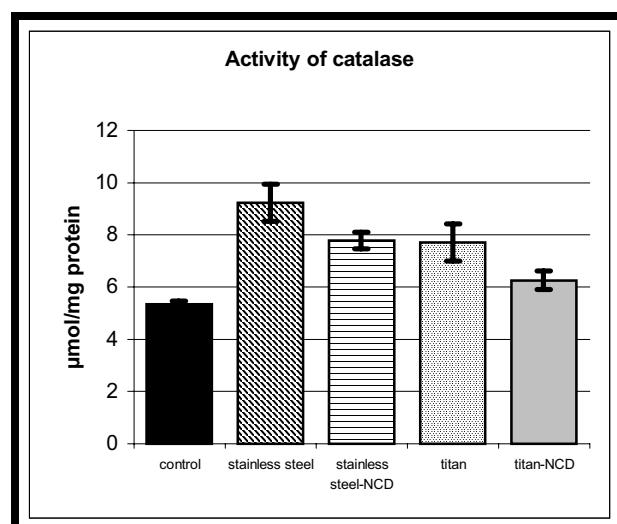
Fibroblast cells were grown in the standard conditions: 37°C, 5% CO₂ and 95 % humidity. Samples were put into a T-flask containing confluent cells, and antioxidant parameters (a total anti-oxidative capacity, a level of total glutathione concentration and an activity of catalase) were estimated after 24 hours of incubation. Cells were harvested with trypsin, centrifuged and suspended (2x10⁷ cells per ml) in a lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 2 mg/ml lepton, 2 mg/ml aprotinin).

Total anti-oxidative capacity was measured with 2,7-

w 1 ml buforu do lizy (10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 2 mg/ml leptyny, 2 mg/ml aprotininy).

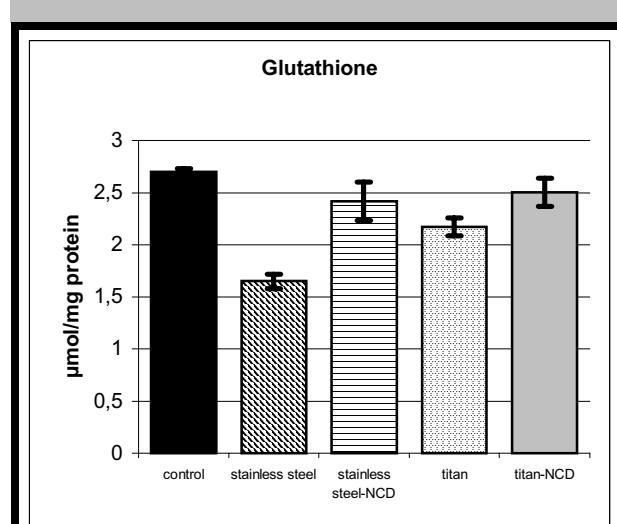
Całkowita pojemność antyoksydacyjną mierzono przy użyciu spektrofluorymetru Perkin-Elmer LS-5B stosując dioctan 2,7-dichlorofluoresceiny (wzbudzenie i emisja przy długości fali 488 i 520 nm) [8]. Do lizatu komórkowego (1 ml) do dodawano H₂DCFDA (Molecular Probes) do końcowego stężenie 10 mM. Po 20 min inkubacji w temperaturze 28°C, homogenat komórkowy był odwirowywany (3500 x g, 3 min.) i mierzono jego fluorescencję.

Aktywność katalazy oceniano w homogenatach komórkowych przez dodanie H₂O₂ i pomiar spadku absorpcji przy 240 nm, gdzie szybkość rozkładu nadtlenku wodoru był miarą aktywności katalazy [9]. Objętość 333 µl wodnego roztworu H₂O₂ (54 mM) uzupełniano do 1 ml buforem fosforanowym (50 mM, pH 7,4) i dodawano 100 µl lizatu komórkowego. Mierzono spadek absorbancji przy 240 nm. Rozkład 1 mmol substratu w ciągu 1 min jest miarą jednej jednostki aktywności katalazy.



RYS. 1. Aktywność katalazy w fibroblastach hodowanych w kontakcie z biomateriałami.

FIG. 1. Catalase activity measured for fibroblasts grown in contact with biomaterials.



RYS. 2. Stężenie glutationu w fibroblastach hodowanych w kontakcie z biomateriałami.

FIG. 2. Glutathione concentration in fibroblasts grown in contact with biomaterials.

dichlorofluorescin diacetate using Perkin-Elmer LS-5B spectrofluorimeter (excitation and emission wavelengths of 488 and 520 nm, respectively) [8]. The H₂DCFDA (Molecular Probes) was added into 1 ml of cell homogenate to the final concentration of 10 mM. After 20 min incubation at 28°C, the homogenate was centrifuged (3500 x g, 3 min.) and fluorescence was estimated.

For estimation of catalase activity the cell homogenate was supplemented with H₂O₂ and a rate of fall in the light absorption at 240 nm, corresponding to catalase activity, was measured [9]. The volume of 333 µl of H₂O₂ water solution (54 mM) was filled up to 1 ml with phosphate buffer (50 mM, pH 7,4) and then 100 µl of cell homogenate was added. Immediately a fall of absorbance at 240 nm was measured. Decomposition of 1 mmol substrate during 1 minute gives 1 unit of catalase activity.

A level of total glutathione concentration was estimated by the cyclic oxidation method. Glutathione was extracted from the cells with 2M of cold HClO₄ (containing 4 mM EDTA). After neutralization with KOH, 100 µl of extract sample was supplemented with 50 µl 0.4 % NADPH w 0.5 % NaHCO₃, 20 µl 0.15% 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and 20 µl of glutathione reductase solution (activity of 6 U/ml). The rate of absorbance increase, measured at 412 nm, was proportional to glutathione concentration [10].

Results

An increase in catalase activity for cells, having a contact with all the studied biomaterials, was observed. But the higher level was observed for stainless steel samples (FIG. 1). In the case of a total glutathione concentration, and a total anti-oxidative capacity, a drop in measured values was observed for all samples (FIG. 2 and 3). The highest fall in a total glutathione concentration level, and in an antioxidative capacity, was estimated for fibroblast after a contact with stainless steel, whereas the lowest changes were caused by titanium alloy coated with NCD (FIG. 2 and 3). All the measured parameters differentiated the cells allowed for contact with biomaterials from control ones, and the studied biomaterials can be ordered according to a decreasing difference as follows: medical steel, titanium alloy, medical steel coated with NCD and titanium alloy coated with NCD.

Discussion

A material introduced into the human body should not induce cell response corresponding to stressful conditions. A comparison of biochemical parameters, undergoing to change in response to cell exposure to unfavourable conditions, has been made in this study. An analysis of differences between control cells and cells allowed for contact with the studied materials permitted biocompatibility estimation of the biomaterials surfaces. One of the most characteristic parameter is the level of catalase activity. An increase in this enzyme activity is observed as a response to most stressful conditions: heat stress, shear stress or oxidizing substances [1, 3, 11].

In the case of fibroblast culture, in the presence of biomaterials, increases in the enzyme activity also occur, and the highest increase was observed in the cells allowed for contact with medical steel. It suggests the lowest biocompatibility of medical steel in respect to contact with fibroblasts.

Similar conclusions result from analysis of a total glutathione concentration and a level of total anti-oxidative capacity of the cells. Glutathione is a tripeptide involved in

Poziom stężenia całkowitego glutationu oznaczany był z użyciem metody cyklicznego utleniania. Glutation był eks-trahowany z komórek przez dodanie zimnego 2M HClO₄ (zawierającego 4 mM EDTA). Do 100 µl próbki, zneutralizowanej przez dodanie KOH, dodawano: 50 µl 0,4 % NADPH w 0,5 % NaHCO₃, 20 µl 0,15% kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoidowego) i 20 µl roztworu reduktazy glutationowej o aktywności 6 U/ml. Szybkość wzrostu absorbancji, mierzona przy 412 nm, była proporcjonalna do stężenia glutonu [10].

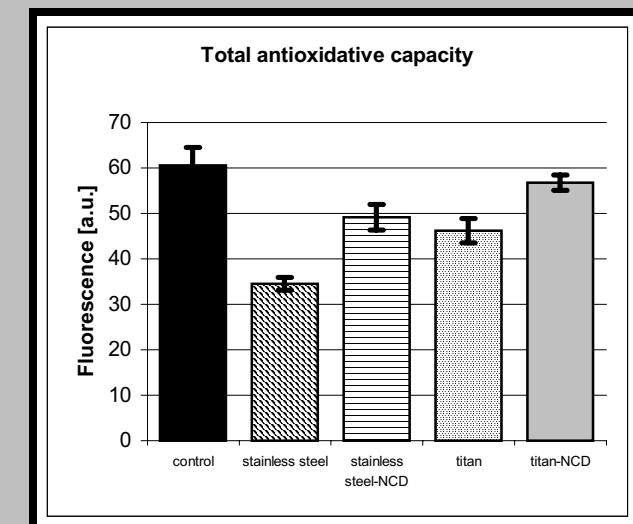
Rezultaty

We wszystkich komórkach mających kontakt z biomateriałami obserwowało wzrost aktywności katalazy, jednak najwyższy wzrost był obserwowany dla komórek hodowanych w kontakcie z próbками stali medycznej (RYS. 1). W przypadku oznaczania stężenia całkowitego glutonu i całkowitego poziomu antyoksydacyjnego obserwowany był spadek oznaczanych wartości dla wszystkich prób w odniesieniu do hodowli kontrolnej (RYS. 2 i 3). Największe obniżenie stężenia całkowitego glutonu i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej występowało u fibroblastów hodowanych w kontakcie z stalą medyczną, natomiast najmniejsze zmiany tych parametrów powodował kontakt z próbkiem stopu tytanu pokrytego warstwą NCD (RYS. 2 i 3). Wszystkie oznaczane parametry biochemiczne, uzyskane dla fibroblastów hodowanych w kontakcie z biomateriałami, wykazywały odstępstwa od parametrów komórek kontrolnych, w kolejności od zmian największych do najmniejszych: stal medyczna, stop tytanu, stal medyczna pokryta NCD, stop tytanu pokryty NCD.

Dyskusja

Materiał wprowadzany do ludzkiego ciała nie powinien indukować odpowiedzi komórkowej charakterystycznej dla warunków stresowych. W przeprowadzonych badaniach porównywano parametry biochemiczne ulegające zmianie w efekcie ekspozycji komórki do niekorzystnych warunków. Analiza różnic między komórkami kontrolnymi a komórkami pozostającymi w kontakcie z materiałem pozwala na ocenę biozgodności powierzchni biomateriałów. Jednym z najbardziej charakterystycznych parametrów jest poziom aktywności katalazy. Wzrost ekspresji tego enzymu jest obserwowany w odpowiedzi na większość warunków stresujących, takich jak: stres cieplny, stres mechaniczny czy ekspozycja na substancje utleniające [1, 3, 11]. W przypadku hodowli fibroblastów w obecności biomateriałów także dochodzi do wzrostu aktywności tego enzymu, przy czym najwyższy wzrost obserwowało w komórkach poddanych kontaktowi z powierzchnią stali medycznej. Sugeruje to najniższą biozgodność stali medycznej w kontakcie z fibroblastami.

Do podobnych wniosków prowadzi analiza stężenia całkowitego glutonu w komórkach i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej. Gluton jest trójpeptydem zaangażowanym w ochronę przed reaktywnymi formami tlenu oraz detoksycację komórki poprzez tworzenie S-konigatów z ksenobiotykami [12, 13]. Natomiast całkowita pojemność antyoksydacyjna jest wyznacznikiem ogólnej kondycji komórek, a jej obniżenie świadczy o zaburzeniu homeostazy [13]. W wyniku kontaktu fibroblastów z biomateriałami dochodziło do obniżenia zarówno całkowitego stężenia glutonu (GSSG/GSH), jak i całkowitej pojemności antyoksydacyjnej. Największe różnice obu parametrów, w stosunku do komórek kontrolnych, obserwowało w efekcie kontaktu ze stali medyczna, co jest zgodne z obserwacjami wzrostu



RYS.3. Całkowita pojemność antyoksydacyjna fibroblastów hodowanych w kontakcie z biomateriałami.

FIG.3. Total antioxidative capacity of fibroblasts grown in contact with biomaterials.

protection from reactive oxygen species and cell detoxification by formation of S-conjugates with xenobiotics [12, 13]. However a total anti-oxidative capacity is a determinant of homeostasis disturbance [13]. As a result of fibroblasts contact with biomaterials a decrease in a total glutathion concentration (GSSG/GSH) as well as in a total anti-oxidative capacity was observed. The most significant differences, in comparison to the control cells, were observed for medical steel, and it is in good accordance with an increase in the catalase activity. The lowest differences were observed for fibroblasts allowed for contact with NCD surface coating titanium alloy substrate.

Not less interesting is also comparison of results obtained for groups: metal-metal substrate coated with NCD. In all the cases, the presence of NCD surface on a metal substrate, instead of metal alone, significantly reduced differences between parameters obtained for control cells and cells interacting with NCD. The results indicate weaker effect of oxidative stress caused by metallic substrate separated from the cells by NCD layer. In conclusion one can say that surface modification of metallic substrate, by synthesis of NCD layer, increases biocompatibility of the material.

Acknowledgements

This work was partially supported by the KBN grant no. 1137/T08/2001/20

Piśmiennictwo

- [1] Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990; 51: 283-297.
- [2] Steinmann M, Moosmann N, Schimmel M, Gerhardus C, Bauer G: Differential role of extra- and intracellular superoxide anions for nitric oxide-mediated apoptosis induction. *In Vivo* 2004; 18: 293-309.
- [3] Heufelder AE, Wenzel BE, Bahn RS: Methimazole and propylthiouracil inhibit the oxygen free radical-induced expression of a 72 kilodalton heat shock protein in Graves' retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 737-742.
- [4] Meewes C, Brenneisen P, Wenk J, Kuhr L, Ma W, Aliksoski J,

References

aktywności katalazy. Także w przypadku tych oznaczeń wartości oznaczanych parametrów były najbliższe wartościom kontrolnym w komórkach hodowanych w obecności tytanu pokrytego NCD.

Nie mniej interesujące jest porównanie uzyskanych wyników w grupach: metal - metal pokryty warstwą NCD. We wszystkich przypadkach, obecność powierzchni NCD na podłożu metalicznym, zamiast samego metalu, powodowała znaczące obniżenie różnic parametrów uzyskanych dla komórek kontrolnych i komórek oddziałujących z NCD. Uzyskane wyniki wskazują na słabszy efekt stresu oksydacyjnego w komórkach odizolowanych od powierzchni metalicznych warstwą NCD. Można wnioskować, że modyfikacja powierzchni metalicznej, wykonana poprzez nałożenie warstwy nanokrystalicznego diamentu, podwyższa biozgodność materiału.

Podziękowania

Badania przeprowadzono w ramach projektu badawczego KBN nr 1137/T08/2001/20

Poswig A, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K: Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 238-247.

[5] Ryhanen J, Niemi E, Serlo W, Niemela E, Sandvik P, Pernu H, Salo T: Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 451-457.

[6] Morena M, Cristol JP, Senecal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B: Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int Suppl* 2002;80, 109-114.

[7] Mitura S, Mitura A, Niedzielski P, Couvrat P: Nanocrystalline Diamond Coatings. *J Chaos, Solitons and Fractals* 1999: 2165-2177.

[8] Jakubowski W, Bartosz G: 2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 2000; 24: 757-760.

[9] Jakubowski W, Bilinski T, Bartosz G: Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 659-664.

[10] Akerboom TP, Sies H: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-382.

[11] Arbault S, Pantano P, Jankowski JA, Vuillaume M, Amatore C: Monitoring an oxidative stress mechanism at a single human fibroblast. *Anal Chem* 1995; 67:3382-3390.

[12] Grzegorz B: Metabolizm glutattonu. *Postępy Biochemii* 1993;39: 32-38.

[13] Grzegorz B: Druga twarz tlenu. PWN, 1995.

ZASTOSOWANIE BIOMATERIAŁÓW Z WARSTWAMI WĘGLOWYMI DO PRZEKŁUWANIA CIAŁA

BOCIĄGA D.*; GRABARCYK J.*; NIEDZIELSKI P.*; KRAKOS M.;**
MITURA K.*

* CENTRUM DOSKOŃALOŚCI NANODIAM,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA W ŁÓDZI, INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLSKA

** UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁÓDZI,
INSTYTUT PEDIATRII, POLSKA

Słowa kluczowe: warstwy węglowe, przekłuwanie ciała, "piercing", reakcja alergiczna, alergeny metali, biomateriały
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 66-70]

Wprowadzenie

Przez ostatnich kilka lat ozdabianie ciała stało się bardzo popularne. Trudno jest przejść ulicą czy oglądać telewizję i nie natknąć się na osobę, która poddała się zbiegowi "piercingu". Czym jest dokładnie "piercing"? To przekłucie ciała, które następuje przy pomocy igły, po czym w miejscu to zakładana jest ozdoba (swego rodzaju biżuteria). Najbardziej popularnymi miejscami przekłuć są: uszy, usta, nozdrza, brwi, pępek, język, policzki, jak również miejsca intymne. Niewątpliwie więc przekłuwanie ciała związane jest z obecnością w organizmie różnego rodzaju swoistych "implantów", które są wykonywane z różnorodnych stopów

APPLICATION OF BIOMATERIALS WITH CARBON COATINGS FOR BODY PIERCING

BOCIĄGA D.*; GRABARCYK J.*; NIEDZIELSKI P.*; KRAKOS M.;**
MITURA K.*

* CENTER OF EXCELLENCE NANODIAM,
TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE, BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION, POLAND

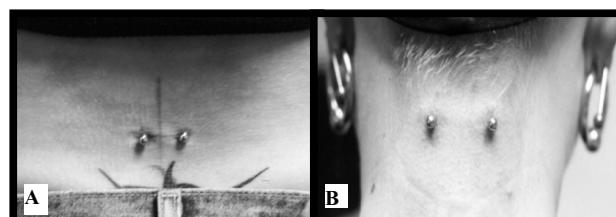
** MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ,
INSTITUTE OF PEDIATRICS, POLAND

Key words: carbon coatings, body piercing, allergic reaction, metal allergens, biomaterials
[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 66-70]

Introduction

Over the past few years, body art has become popular, and it's hard to walk down the street or watch TV without seeing someone with piercing. A body piercing is exactly that - a piercing or puncture is made in the body by a needle. After that, a piece of jewelery is inserted into the puncture. The most popular pierced body parts seem to be the ears, lips, nostrils, eyebrows, belly buttons, tongues, or even cheeks and intimate organs. Therefore the body piercing is connected with the presence of various "implants" in human body, which currently are usually made from the various alloys. Besides of cosmetic and visual effects, the most important is the clinical results of this implantation. The many human disorders can be developing after the body piercing

metali. Poza walorami estetycznymi o wiele bardziej istotne są kliniczne skutki takiej implantacji. Wiele zaburzeń zdrowotnych może być wywoływanych przez tzw. "piercing" [1]. Infekcje bardzo często towarzyszą przekluwaniu ust czy też nosa ze względu na szczególnie dużą ilość bakterii żyjących w tych częściach ciała. Ozdoba w języku może po pewnym czasie doprowadzić do zniszczenia zębów oraz powodować problemy z żuchwą, których powodem może być również przekłucie policzka czy ust. Badania pokazały, że u osób z pewnego rodzaju zaburzeniami pracy serca "piercing" może podwyższać ryzyko wystąpienia infekcji mięśnia sercowego. Problemy medyczne, takie jak alergia na metale [2] czy choroby skóry, mogą być także następstwem przeklucia, co jest bezpośrednio związane z rodzajem materiału, z którego została wykonana ozdoba umieszczona w miejscu przeklucia. W większości przypadków stopy metali, z których wykonana jest biżuteria, zawierają pierwiastki podrażniające, takie jak chrom, kobalt i nikiel, który jest najbardziej popularnym metalem wywołującym reakcję alergiczną [3]. Około 15 % osób przebadanych pod kątem alergii okazało się być uczulonymi na nikiel. Ciało nie reaguje na sam pierwiastek, lecz na jego sole, a te wytwarzane są podczas kontaktu metalu ze skórą [4].



RYS. 1. [A,B] Przykłady reakcji na wkłuty "implant".

FIG. 1. [A,B] Examples of reaction for the pierced

[1]. Infection is a common complication of mouth and nose piercings because of the millions of bacteria that live in those areas. Tongue piercings can damage teeth over time. Tongue, cheek, and lip piercings can cause gum problems. Studies have shown that people with certain types of heart disease might have a higher risk of developing a heart infection after body piercing. Medical problem such a metal allergies [2], skin disorders can be a result of piercing as well - it is directly connected with a type of material implanted as a decoration. In most cases these materials contain irritating elements like chromium or cobalt and nickel which is the most common of all metal allergens [3].

Approximately 15 percent of all individuals who are patch tested for allergies turn out to be allergic to nickel. The body does not actually react to the nickel itself; the allergic reaction is caused by nickel salts, which are formed when metal comes into contact with skin [4].

The aim

The aim of this work was analysis of the market and working out of the production's technology for the body piercing's jewellery and also testing the allergic abilities of these special kind of "biomaterials". It is necessary to give a thorough examination and systematize materials, which are used to the body piercing taking into consideration their allergic and corrosion ability and also the right protection of the biomaterial's surface against penetration of metal ions to the organism. These actions are in order to get a material, which will be nonallergic - material covered by a carbon coatings, which will combine protective properties with decorative virtues.

Materials and methods

Tests were carried on in two ways: biological part with patients sensitized on nickel, cobalt and chromium and material part (technical). The subject of investigation were two groups of material: a) the most popular and freely available piercing jewellery, b) decoration sorted from the "a" group (including a big amount of irritating elements) with surfaces modified by decorative carbon coatings. To this end two CVD (Chemical Vapour Deposition) methods were used: RF (Radio Frequency) PCVD, which use high frequency discharge or RF/MW (Radio Frequency/MicroWave) CVD at which two-frequency RF/MW plasma was applied [5]. Using these two methods interchangeably allowed to regulate a physicochemical properties of coated coatings (like: thickness, corrosion resistance, color, etc.)

Technical investigations were experimented in order to get such a pierced material, which would not cause an allergic organism response and would protect organism against penetration and accumulation of the substrate material's ions - safe material for piercing. Various "implants" using for piercing were examined taking into consideration their composition and corrosion resistance.

The analysis of the samples composition of metal decoration the most common used for piercing and the same decoration after surface modification, was made on the HITACHI S-3000N scanning microscope.

As the next step the piercing jewellery was put to the corrosion resistance test. Stepped-up corrosion tests in the Gepert's solution were carried out on each decoration, which was previously checked in chemical composition respect. Condition of each sample has been checked after 5, 15, 25 and 40 minutes.

Taking into consideration a good biomedical, physical

Cel pracy

Celem badań była analiza rynku oraz opracowanie technologii wytwarzania bezpiecznych metalowych ozdób używanych do przekluwania ciała oraz zbadanie zdolności alergicznych tych specyficznych "biomateriałów". Koniecznym jest bowiem przebadanie i usystematyzowanie tak powszechnie stosowanych ozdób metalowych biorąc pod uwagę ich zdolności alergenne, odporność korozyjną jak również zdolności ochronne przed przenikaniem do organizmu jonów metali. Badania miały na celu opracowanie materiału, który nie powodowałby reakcji uczuleniowych - materiału pokrytego warstwą węglową łączącą w sobie właściwości ochronne (bariera dla jonów metalu stanowiącego podłożo) oraz dekoracyjne.

Materiały i metodyka

Badania prowadzone były dwukierunkowo: część biologiczna na pacjentach uczulonych na nikiel, kobalt i chrom oraz część materiałowa (techniczna). Przedmiotem badań były dwie grupy materiałów: a) biżuteria powszechnie dostępna i najczęściej stosowana do przekluwania ciała, b) wyselekcjonowane z poprzedniej grupy ozdoby (zawierające duże ilości pierwiastków drażniących) zmodyfikowane powierzchniowo dekoracyjnymi warstwami węglowymi. Do tego celu wykorzystane zostały dwa metody CVD (Chemical Vapour Deposition): RF PCVD wykorzystująca wyładowanie wysokiej częstotliwości oraz RF/MW CVD z zastoso-

waniem plazmy dwuczęstotliwościowej RF/MW [5]. Zamienne wykorzystanie tych metod dało możliwości regulacji właściwości fizykochemicznych nanoszonych warstw (tj. grubość, odporność korozyjna, kolor, itp.).

Badania materiałowe zostały przeprowadzone w celu uzyskania takiego materiału do przekłuc, który by nie powodował odpowiedzi alergicznej organizmu oraz chronił organizm przed przenikaniem i odkładaniem się w nim jonów metalu podłożo - bezpiecznego materiału do "piercingu". Różne próbki, które stanowiły metalowe ozdoby, przebadane zostały pod kątem składu chemicznego i odporności korozyjnej.

Analiza składu próbek, które stanowiły ozdoby używane powszechnie do przekłuc oraz te same ozdoby po modyfikacji powierzchniowej, została przeprowadzona za pomocą mikroskopu skaningowego HITACHI S-3000N.

Kolejnym krokiem było zbadanie odporności korozyjnej metalowych ozdób. Przeprowadzone zostały w tym celu przyspieszone badania korozyjne w roztworze Geperta dla każdej uprzednio sprawdzonej pod względem składu chemicznego próbki. Czas próby: 5, 15, 25 i 40 minut dla każdego elementu.

Biorąc pod uwagę dobre właściwości biomedyczne, fizyczne i mechaniczne warstw węglowych wytwarzanych metodami RF/MV PCVD (biozgodność [6], dobra adhezja do podłoży stalowych, dobre właściwości ochronne przed korozją metali, duża wytrzymałość mechaniczna, ochrona przed metalozą) [7], powierzchnie metalowych ozdób zostały zmodyfikowane w plazmie RF/MV. Pokrywanie biżuterii używanej do przeklucia ciała warstwami węglowymi miało na celu uzyskanie na nich bariery chroniącej przed przenikaniem jonów metali do organizmu żywego a co za tym idzie do ochrony przed podrażnieniami oraz dalszymi komplikacjami [8].

Zakładając, iż warstwy węglowe stanowią barierę dla przenikania jonów metali do organizmu człowieka, przeprowadzone zostały testy płatkowe skórne z użyciem ozdób metalowych pokrytych warstwami węglowymi. Badanie to zostało przeprowadzone w celu potwierdzenia założeń przez wyniki badań klinicznych. Testy płatkowe przeprowadzone zostały na pacjentach, u których wcześniejsze badania wykazały wrażliwość na metale (szczególnie na nikiel). Trzy zestawy próbek (pokrytych i nie pokrytych warstwami węglowymi) nałożono na skórę pleców trzech różnych pacjentów. Zgodnie z zasadami przeprowadzania testów płatkowych [9], przyłożone próbki zostały usunięte po 48 godzinach a wyniki zostały odczytane po 48 i 72 godzinach.

Wyniki

Badania składu chemicznego ozdób używanych do zabiegów "piercingu" wykazały, że bardzo często są one wykonywane z materiałów zawierających ponadnormowe ilości drażniących pierwiastków, takich jak: nikiel, miedź, cynk, kobalt, chrom. Wyniki analizy przeprowadzonej przy użyciu mikroskopu skaningowego HITACHI S-3000N na próbках wykonanych z najbardziej popularnej i najczęściej kupowanej biżuterii do przekłuc pokazuje TABELA 1.

Podczas badania odporności korozyjnej w roztworze Geperta stan każdej ozdoby oceniany był kolejno po 5, 15, 25 i 40 minutach. Intensywność roztrzaskania była różna dla poszczególnych metali, nie mniej jednak już po 5 minutach każda z ozdób wykazywała cechy korozji i uwalniała jony metalu do roztworu.

Testy płatkowe wykonane zostały zgodnie z zasadami przyjętymi przez Międzynarodową Grupę Badającą Wyprysk Kontaktowy [10]. Wyniki badań dla zestawów próbek zawierających pokryte i nie pokryte warstwami węglowymi materiały do "piercingu" przedstawiają RYS. 3, 4, 5.

and mechanical properties of carbon coatings manufacturing by RF/MV PCVD methods (biocompatibility [6], good adhesion to steel substrates, good protection properties for metals against corrosion, high mechanical strength, protection against metalosis) [7] piercing decorations' surface was modified by using the RF/MW plasma. The aim of this carbon covering procedure was to get a material for this special kind of "implants" which will combine protective properties with decorative virtues [8].

Taking into consideration assumption that carbon coatings should protect human skin against penetration of nickel ions into tissues, by using coated piercing decorations, skin patch tests were conducted to check, whether the results of clinical examinations confirm the assumption. In this connection patch tests were conducted on people who prior skin tests revealed sensitivity to metals (especially nickel). Three sets of samples (covered and without carbon layer) were applied to the skin of back of three various patients. In accordance with the principle of patch tests conducting [9], taped samples were removed after 48 hours and the test results had been read at 48 hours and again at 72 hours.

Results

The analysis of the samples' chemical composition, of metal decoration used for piercing, showed that very often these are made of materials, which include very big amount of irritating elements, like: nickel, copper, zinc, cobalt, chromium. The results of analysis, which were carried out on the samples made from the most common and the most often buying piercing decorations, by using scanning microscope HITACHI S-3000N, shows TABLE 1.

Numer próbki Number of the sample	1	2	3	4
Skład Composition	Fe 68,08 Cr 19,80 Ni 9,37 Mn 1,90 Si 0,85		Fe 68,37 Cr 19,96 Ni 9,03 Mn 1,87 Cu 66,55 Zn 33,45	Fe 62,97 Cr 22,47 Ni 11,89 Mn 2,67 Si 0,68 S 0,09
[%]				

TABELA 1. Wyniki badania składu chemicznego metalowych ozdób używanych do zabiegów "piercingu".

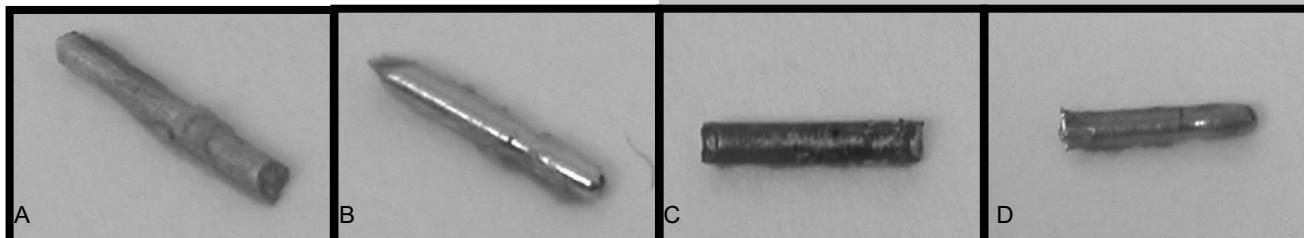
TABLE 1. Results of the composition's examination of the various piercing's jewellery.

During corrosion resistance test in the Gepert's solution condition of each sample has been checked after 5, 15, 25 and 40 minutes. Intensity of the dissolution was various but nevertheless after 5 minutes each of decorations started to corrode and release the metal ions into the solution.

Patch tests were carried out in accordance with the rules accepted by International Commision Testing the Contact Dermatitis [10]. Results of patch tests conducted by using sets including covered and uncovered piercing materials samples present FIGs. 3, 4, 5.

Discussion and conclusions

The preliminary analysis showed that jewellery using for the body piercing (especially these cheap, freely available and thus the most often buying) is made from materials including significant amounts of elements, which causing strong irritation and allergic reactions, like: nickel, copper, zinc, cobalt, chromium. Long-lasting contact of these



RYS. 2. Wyniki testu korozyjnego w roztworze Geperta dla różnych ozdób używanych w "piercingu".
A.Próbka nr 2 po 5 minutach, B.Próbka nr 3 po 5 minutach, C.Próbka nr 2 po 25 minutach, D.Próbka nr 3 po 25 minutach.

FIG. 2. Results of corrosion test in the Gepert's solution carried out on various piercing decoration.
A.Sample number 2 after 5 minutes, B.Sample number 3 after 5 minutes, C.Sample number 2 after 25 minutes,
D.Sample number 3 after 25 minutes.



RYS. 3. Reakcja organizmu na sole metali Ni, Co, Cr w teście płatkowym.
FIG. 3. Organism reaction to salts of metals (Ni, Co, Cr) in laboratory contact test.

RYS. 4. Wynik testu płatkowego - pacjent 1. Wyraźna reakcja organizmu na próbki nie pokryte warstwą węglową.
FIG. 4. Result of skin patch test - patient 1. Reaction to the samples without carbon coatings.

Rys. 5. Wynik testu płatkowego-pacjent 2. Reakcja na próbki pokryte warstwą węglową. Brak podrażnienia i reakcji alergicznej.
FIG. 5. Result of skin patch test-patient 2. Reaction to the samples with carbon coatings. Absence of irritation and allergic reaction.

Dyskusja i wnioski

Wstępne badania pokazują, że biżuteria używana do przekluwania ciała (szczególnie ta tania, ogólnie dostępna a przez to najczęściej kupowana i noszona) jest wykonana z materiałów, które zawierają znaczne ilości pierwiastków wywołujących silne podrażnienia i reakcje alergiczne, jak: nikiel, miedź, cynk, kobalt, chrom. Długotrwały kontakt tych elementów z tkanką żywą powoduje przenikanie jonów metali do organizmu człowieka. W konsekwencji może doprowadzać nie tylko do silnych zaburzeń alergicznych, ale również do odkładania się poszczególnych pierwiastków w narządach i prowadzić do nieodwracalnych zmian. Wyniki badań klinicznych pokazują, że warstwa węglowa, pokrywająca powierzchnię biżuterii, stanowi doskonałą barierę dla jonów metali podłożu (ozdoby), dzięki czemu chroni przed przenikaniem i odkładaniem się alergennych jonów metali oraz przed bezpośrednim kontaktem tkanki żywnej z alergenem, a poprzez to zapobiega reakcjom alergicznym.

Podziękowania

Praca ta została sfinansowana przez Polski Komitet Badań Naukowych w latach 2002-2005 w ramach projektu Nr KBN-082/T08/09.

elements which a living tissue causes a metal ions penetration into the human organism. As a consequence that can result in strong allergic disorders, but also in accumulation of metal ions in organs and because of that lead to irreparable changes. The results of clinical examinations show that carbon coating, covering the surface of jewellery, is a great barrier for ions of substrate's metals (decorations), thanks to that protects against penetration and accumulation of allergic metal ions and against direct contact between living tissue and allergen. Through that prevents allergic reactions.

Acknowledgements

This work was financed by Polish State Committee in years 2002-2005 for Scientific Research No. KBN-082/T08/09

- [1] Margaret Oot Hayes, BSN, Gail A. Harkness, DrPH, FAAN, Durham, New Hampshire: Practice Forum: Body piercing as a risk factor for viral hepatitis: An integrative research review. American Journal of Infection Control, 2001; 29(4): 271-4.
- [2] Ehrlich, Alison; Kucenic, Michael; Belsito, Donald V.: Role of body piercing in the induction of metal allergies. American Journal of Contact Dermatitis, 2001; 12(3): 151-155.
- [3] L.Budinger, M.Hertl: Immunological mechanism in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. Allergy, 2000; 55:108-115.
- [4] Haudechy P., Foussereau J., Mantout B., Baroux B.: Nickel release from 304 and 316 stainless steels in synthetic sweat. Comparison with nickel and nickel-plated metals. Consequences on allergic contact dermatitis, Corrosion Science, 1993; 35 (1-4): 329-336.

References

- [5] Mitura S., Mitura E., Mitura A.: Manufacturing of amorphous carbon layers by RF dense plasma, Diamond Rel. Materials, 1995; 4: 302-303.
- [6] Katarzyna Bąkowicz and Stanisław Mitura: Biocompatibility of NCD, Journal of Wide Bandgap Materials, 2002;4, Vol.9
- [7] Tang L., Tsai C., Gerberich W.W., Kruckeberg L., Kania D.R.: Biocompatibility of chemical-vapor-deposited diamond, Biomaterials, 1995;16: 483-488.
- [8] Mitura S., Niedzielski P., Marciniak J., Stanishevsky A., Tochitsky E., Louda P., Couvrat P., Denis M., Lourdin P.: Influence of carbon coatings origin on the properties important for biomedical application, Diamond Rel. Materials, 1996; 5: 1185-1188.
- [9] Mazurek H.: Testy skórne w praktyce, Wydawnictwo Medipress, Choroby dróg oddechowych, 1997; 2: 15-20.
- [10] S. Fregert:, Manual of Contact Dermatitis , 2nd edition, Munksgaard, Copenhagen 1981.

HAMOWANIE PROCESU HEMOLIZY W OBECNOŚCI PROSZKU DIAMENTOWEGO W WARUNKACH USZKODZENIA PRZEZ WOLNE RODNIKI

KATARZYNA MITURA*, GRZEGORZ BARTOSZ**,
STANISŁAW MITURA*

*ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ
**KATEDRA BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ UNIWERSYTETU ŁÓDZKIEGO

Streszczenie

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem powodującym uszkodzenie błony komórkowej, w tym błony erytrocytu. Jest to łańcuchowa reakcja wolnorodnikowa, w wyniku której powstające wolne rodniki [1,2], uszkadzając strukturę tej błony, zmieniają jej właściwości półprzepuszczalne i powodują zmianę konformacji dwuwarstwy lipidowo-białkowej. Powstałe w wyniku procesu peroksydacji lipidów, toksyczne produkty - nadtlenki lipidów, wbudowując się w błonę komórkową, mogą być przyczyną uszkodzenia całej komórki, a przede wszystkim jej materiału genetycznego zawartego w jądrze komórkowym. Tak uszkodzona błona komórkowa erytrocytu, powoduje zaburzenie w funkcjonowaniu tej krwinki, które nazywa się zjawiskiem hemolizy. Klinicznie hemoliza to niedokrwistość hemolityczna, czyli zmniejszenie liczby krvinek czerwonych we krwi obwodowej, spowodowane rozpadem tej krwinki, z powodu uszkodzenia błony komórkowej, uwarunkowane czynnikami zewnętrz- lub wewnętrz-krwinkowymi. Istota samego zjawiska jest odzwierciedleniem procesu chorobowego, jaki dotyczy krvinek czerwoną, a co za tym idzie, wymaga właściwego postępowania terapeutycznego. Leki, które hamują proces hemolizy, nie zawsze spełniają oczekiwania

THE INHIBITION OF HAEMOLYSIS IN PRESENCE DIAMOND POWDER PARTICLES IN CONDITIONS OF FREE RADICAL DAMAGE

KATARZYNA MITURA*, GRZEGORZ BARTOSZ**,
STANISŁAW MITURA*

*BIOMEDICAL ENGINEERING DIVISION,
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, POLAND
**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOPHYSICS, UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
POLAND

Summary

Oxidative stress is the phenomenon which takes part in the damage of cell membrane, for ex.: the erythrocyte membrane. This mechanism is based on the free radical chain reactions [1,2]. The result of this process are the products: free radicals - the cause of the damage of cell membrane structure and change properties of cell membrane fluidity and conformations of phospholipid bilayer. Lipid peroxidation is the cause of the form the toxic products -superoxides lipids in cell membrane and the damage of nucleus which contains a genetic material (DNA) of this cell. Erythrocyte membrane can be destroyed in mechanism of oxidative stress and it is the base of developing the phenomenon of haemolysis. The clinical name of this process is "anemia haemolytica" - the decreasing of amount of erythrocytes in peripheral blood from the exogenous or endogenous factors. Haemolysis is the pathological process in human organism and in aspect of disease can be treated successfully. Medicines, which doctors use to treat this disorder are not completely good because always mechanism of its activity contains only the symptomatic treatment. It seems that Diamond Powder Particles can be used as the alternative therapy of anemia haemolytica [6].

lekarzy i niejednokrotnie nie powodują całkowitego wyleczenia, a działają wyłącznie objawowo. Wydaje się, że zastosowanie proszku diamentowego może być alternatywnym sposobem leczenia tego rodzaju zaburzeń [6].

Słowa kluczowe: proszek diamentowy, hemoliza, stres oksydacyjny
[Inżynieria Biomateriałów, 43-44, (2005), 70-73]

Wprowadzenie

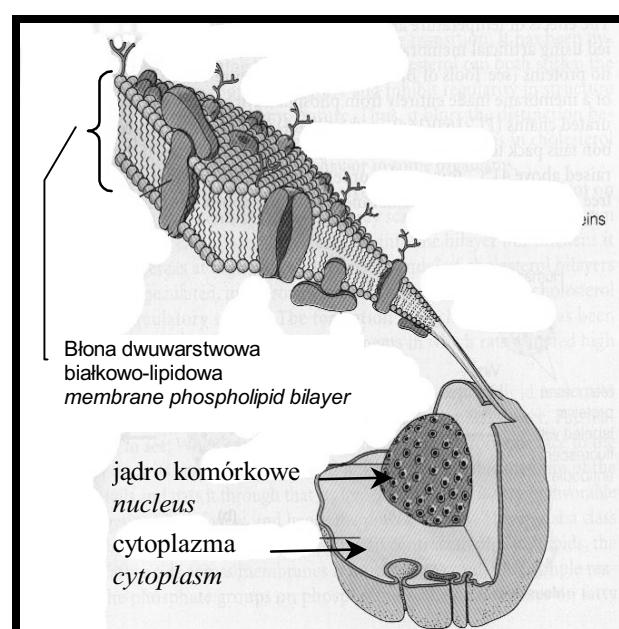
Narządem krwiotwórczym, w którym zachodzi hematopoeza u dorosłego człowieka jest szpik kostny. Hematopoeza czyli krwiotworzenie jest procesem ciągłym, w wyniku którego z wielopotencjalnej komórki macierzystej pnia, znajdującej się w szpiku kostnym, powstają wyspecjalizowane komórki, krążące we krwi. Krążą we krwi obwodowej około 120 dni. Pełnią one jedną z podstawowych funkcji w organizmie, która polega na spersonie cząsteczek tlenu z płuc do tkanek. Krwinki czerwone charakteryzują oznaczane wielkości. Najważniejsze z nich to: liczba w 1 litrze krwi obwodowej - RBC, wskaźnik hematokrytu - Hct, zawartość hemoglobiny - Hb. Otoczka krwinek czerwonych jest błoną półprzepuszczalną, przez którą cząsteczki wody z łatwością dyfundują. [3, 4].

Hemoliza jest procesem w wyniku którego na skutek uszkodzenia krwinek czerwonych dochodzi do zniszczenia erytrocytu, a zatem do skrócenia jego czasu życia.

Przyczynami pierwszego rodzaju hemolizy są defekty w białce komórkowej erytrocytu. Ten typ uszkodzenia erytrocytu spowodowany jest czynnikami wewnętrzkrwinkowymi. Są to wrodzone zmiany w budowie erytrocytu, jego układzie enzymatycznym oraz budowie hemoglobiny.

Drugi typ hemolizy wywołują czynniki pozakrwinkowe i wtedy mamy do czynienia z hemolizą spowodowaną czynnikami zewnętrzkrwinkowymi, tj: przeciwciała, bakterie, czynniki fizyczne i toksyczne [5].

Wszystkie błony biologiczne zawierają lipidy jako głów-



RYS. 1. Budowa typowej błyony komórkowej (dwuwarstwa bialkowo-lipidowa) [10].
 FIG. 1. Structure of a typical cell membrane (phospholipid bilayer) [10].

Key words: Diamond Powder Particles, haemolysis, oxidative stress
[Engineering of Biomaterials, 42-43, (2005), 70-73]

Introduction

Bone marrow is the central organ which is responsible for haematopoiesis in adult people. Haematopoiesis is the continuous process. The result of this process is the formation from the stem cell in bone marrow the specialized cell presence in peripheral blood.

Erythrocytes circulate in peripheral blood about 120 days. The basic role of erythrocyte in human organism is the transport of the molecules of oxygen from lungs to tissues.

Red blood cells are characterized by the following parameters: The most important of them are: the amount of erythrocytes in 1 litre of peripheral blood - RBC; hematocrit - Hct; the amount of hemoglobin in erythrocyte - Hb.

The erythrocyte membrane is cell membrane fluidity. The molecules of water can easily go into cell and outside [3, 4].

Haemolysis is the process in human body which is connected with damage of red blood cells.

The result of haemolysis is the cutting short of its life time. The reasons of the first type of haemolysis are the defects in erythrocyte membrane skeleton. This type of damage of erythrocytes is the haemolysis caused by factors in the same red blood cell: These damages are connected with the inborn changes in cell membrane structure and its enzymatic system and the structure of hemoglobin.

The second type of this pathological process is the haemolysis caused by factors besides erythrocyte membrane. The presence of these factors in human organism is the symptom of many diseases. There are: antibodies, bacteria, physics and toxic factors [5].

All biological membranes contain lipids as major constituents. The four major classes of membrane-forming lipids: glycerophospholipids, sphingolipids, glycosphingolipids and glycoglycerolipids. The membranes of living cells are remarkable bits of molecular architecture, with many and varied functions. To say that a membrane is essentially a phospholipid bilayer is a gross oversimplification. Much of our current understanding concerning biological membrane is based upon the fluid mosaic model proposed by S.J.Singer and G.L.Nicholson in 1972. The fluid, asymmetric lipid bilayer carries within it a host of protein.

The erythrocytes of mammals are among the simplest of all cells. The plasma membrane of erythrocytes contains far fewer proteins than are found in most other cell membranes, in keeping with the simple metabolism of these cells. The erythrocyte, like many other cells, has a complex "skeleton" of proteins underlying and attached to its plasma membrane. The normal state of equilibrium for a substance that can pass through a membrane is equalization of the concentration on both sides. In active transport, substances are moved across a membrane against a concentration gradient. Coupling ATP hydrolysis to the transport usually provides the required free energy. The Na⁺ - K⁺ pump acts in all cells to maintain higher concentrations of K⁺ inside and Na⁺ outside [10].

The influence of Diamond Powder Particles on biochemical processes in living organism is based on specific, unusual properties of diamond. This biological activity of Diamond Powder Particles contains the phenomenon of the inhibition of oxidative free radical damage in vitro [8,11].

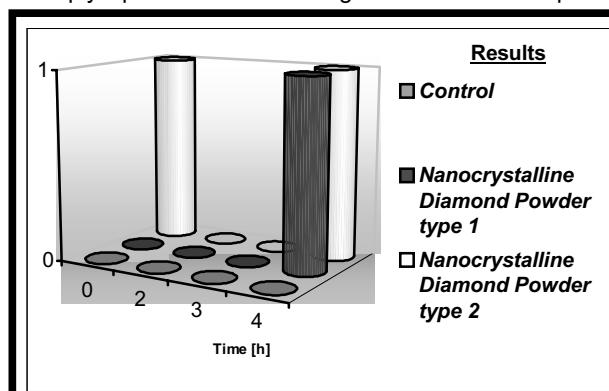
Materials and methods

The effect of nanocrystalline diamond on the hemolysis of human erythrocytes induced by 2,2'-azobis (2-

ne składniki. Wyróżniamy 4 główne klasy lipidów budujących błonę komórkową: glicerofosfolipidy, sfingolipidy, glikofosfogolipidy i glikolicerolipidy. Błony żywych komórek są znaczącym elementem budowy molekularnej, ponieważ pełnią wiele różnych funkcji. Stwierdzenie, że błona jest głównie dwuwarstwą lipidową jest ogromnym uproszczeniem. Wiele z aktualnych doniesień dotyczących błon biologicznych jest opartych na "pływącym modelu mozaikowym" proponowanym przez S.J.Singera i G.L.Nicholsona w 1972. Płynna, asymetryczna dwuwarstwa lipidowa, zawiera obok lipidów mnóstwo białek.

Erytrocyty ssaków są najprostszymi wśród wszystkich komórek. Błona komórkowa erytrocytów zawiera znacznie mniej białek znalezionych w większości w błonach innych komórek, co wynika z prostego metabolizmu tych komórek. Erytrocyt, jak wiele innych komórek posiada kompleks białek szkieletowych, ukrytych i przylegających do ich błony komórkowej. Normalny stan równowagi dla substancji, które mogą przechodzić przez błonę jest równoważony poprzez stężenie po obu stronach błony. W transporcie aktywnym substancje są przemieszczane przez błonę wbrew gradienpowi stężeń. Hydroliza ATP zwykle dostarcza do tego transportu potrzebnej wolnej energii. Pompa sodowo-potasowa we wszystkich komórkach utrzymuje wysokie stężenia jonów potasu wewnętrz komórki i jonów sodu na zewnątrz komórki [10].

Wpływ proszku diamentowego na biochemiczne proce-



RYS. 2. Wykres jakościowej oceny procesu hemolizy.

FIG. 2. The graph of qualitative opinion of haemolysis.

amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) was studied.

In these examinations I used as the material Diamond Powder Particles. We have examined two types of diamond powder D1 i D2: were manufactured by detonation method in Russia [9]. Erythrocytes (hematocrit of 1%) were exposed to 50 mM AAPH in phosphate-buffered saline at 310°K. To mixture of reaction were added the suspensions of D1 and D2 in amount 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l and after incubation at 310°K the time course of hemolysis was monitored by qualitative method and measurement of absorbance of hemoglobin in the supernatants at $\lambda = 414 \times 10^{-9}$ m after 0, 2, 3, 4 h [7].

Conclusions and discussion

- Induction of erythrocytes in the presence of DPP with 2,2,-azo-bis(2-amidinopropane) (AAPH) lead to some degree of haemolysis induced apparently by mechanical damage to the red blood cell membrane (FIG. 2). However, much higher degree of haemolysis was induced by incubation with AAPH. In this case, the presence of DPP decreased the level of hemolysis (FIG. 3).
- The haemolysis induced by AAPH is due to the oxidative damage of erythrocyte membrane by peroxy radicals formed from primary products of thermal hemolysis of AAPH .
- Diamond Powder Particles presents at concentrations of 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l significantly decreased the level of hemolysis

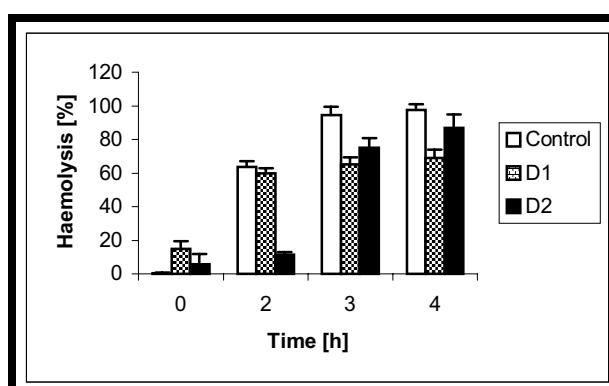
Kontrola - erytrocyty od zdrowych pacjentów
Control - erythrocytes from health patients

Proszek diamentowy typ 1 (biały)-wytworzony metodą detonacyjną -
DPP (white) manufactured by detonation method [9]

Proszek diamentowy typ 2 (czarny)-wytworzony metodą detonacyjną -
DPP (black) manufactured by detonation method [9]

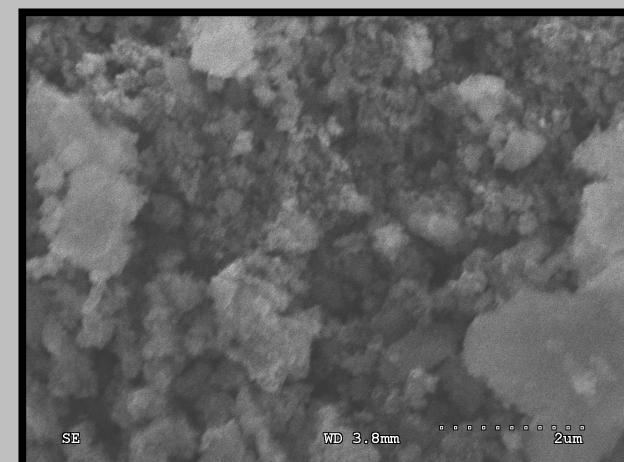
H - hemoliza - hemolysis

- 0 - brak hemolizy - we have not observed haemolysis
1 - mechaniczne uszkodzenie próbki przez nanokryształki diamentu -
mechanical damage of sample by nanocrystalline diamond powder



RYS.3. Wykres ilościowej oceny procesu hemolizy.

FIG. 3. The graph of quantitative opinion of haemolysis.



RYS. 4. Obraz SEM nanokryształicznego diamentu wytworzzonego metodą detonacyjną (D2).

FIG. 4. SEM micrograph of DPP manufactured by detonation metod (D2).

sy w żywym organizmie jest oparty na specyficznych, niezwykłych właściwościach diamentu. Ta biologiczna aktywność proszku diamentowego przejawia się w zjawisku hamowania stresu oksydacyjnego *in vitro* [8, 11].

Materiały i metodyka

Badanie wpływu proszku nanokrystalicznego diamentu na proces hemolizy ludzkich erytrocytów indukowany 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). W tych badaniach został zastosowany jako materiał proszek diamentowy. Zbadaliśmy 2 typy proszków diamentowych D1 i D2 wytworzonych metodą detonacyjną w Rosji [9]. Erytrocyty, w których oznaczony hematokryt wynosił 1 % były eksponowane na 5×10^{-2} M AAPH w buforze fosforanowym w temperaturze 310°K w celu wywołania hemolizy. Do mieszaniny reakcyjnej dodano zawiesiny proszków diamentowych D1 i D2 w ilości 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l. i także inkubowano w temperaturze 310°K. Proces hemolizy był monitorowany metodą jakościową po 0, 2, 3, 4 godzinach oraz metodą ilościową została dokonany pomiar absorbancji hemoglobiny w supernatancie przy długości fali 414×10^{-9} m [7].

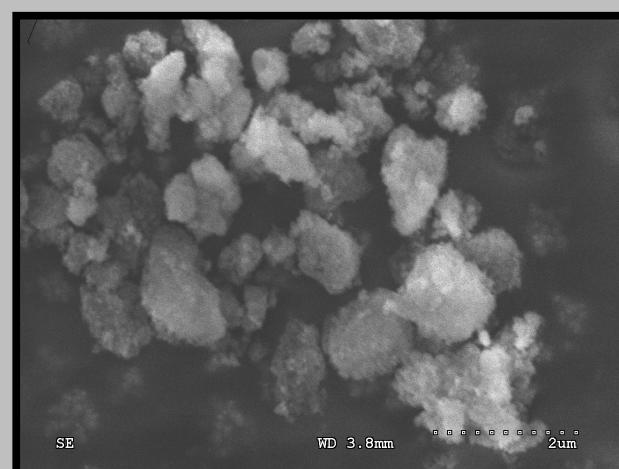
Wnioski i dyskusja

- Indukcja erytrocytów w obecności proszku diamentowego i 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) (AAPH) prowadzi do niewielkiego stopnia hemolizy indukowanej widocznie na skutek mechanicznego uszkodzenia błony komórkowej erytrocytów (RYS.2).
- Jakkolwiek, większy stopień hemolizy był indukowany poprzez inkubację z AAPH. Z tego powodu obecność proszku diamentowego zmniejszyła poziom hemolizy (RYS.3). Hemoliza indukowana przez AAPH jest skutkiem stresu oksydacyjnego w błonie komórkowej erytrocytu, spowodowanego wolnymi rodnikami jako pierwotnymi produktami termicznej hemolizy AAPH.
- Proszek diamentowy obecny w stężeniu 1×10^{-3} g/ 1×10^{-3} l znacznie zmniejsza poziom hemolizy indukowanej przez AAPH.

Efekt ten wydaje się być wynikiem oddziaływanego nanokrystalicznego diamentu z wolnymi rodnikami. Wyniki te potwierdzają tezę o bardzo wysokiej aktywności biologicznej proszku diamentowego w żywym organizmie na poziomie molekularnym. Mechanizm hamowania stresu oksydacyjnego przez proszek diamentowy *in vitro* został poprzez te nowe wyniki poszerzony o wpływ na reakcje wolnorodnikowe w krwinkach czerwonych.

Podziękowania

- Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2005 jako zadanie badawcze zamawiane nr KBN-082/T08/09.
- Dla Pana mgr inż. Grzegorza Bogusławskiego.



RYS. 5. Obraz SEM nanokrystalicznego diamentu wytworzonego metodą detonacyjną (D1).

FIG. 5. SEM micrograph of DPP manufactured by detonation metod (D1).

induced by AAPH.

The effect seems to be due to the reaction of nanocrystalline diamond with peroxy radicals.

These conclusions proved that Diamond Powder Particles has very high biological activity in living organism on molecular level. The mechanism of inhibition of oxidative stress by Diamond Powder Particles in vitro was developing about the new results which show the influence on free radical damage reaction in red blood cells.

Acknowledgements

- The works were financed by the Polish State Committee in years 2002 - 2005 for Scientific Research Nr KBN-082/T08/09.*
- For Msc Grzegorz Bogusławski.*

Piśmiennictwo

References

- [1] G. Bartosz: Druga twarz tlenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995.
- [2] K. Bąkowicz, S. Mitura: "Biocompatibility of NCD", JOURNAL OF WIDE BANDGAP MATERIALS, Vol. 9, No. 4 - April (2002), 261-272.
- [3] W. Traczyk: Fizjologia człowieka w zarysie. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1989.
- [4] T. Robak: Hematologia kliniczna w zarysie. Akademia Medyczna w Łodzi, 1998.
- [5] F. Kokot: Choroby wewnętrzne. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1991.
- [6] M. Bartosz, J. Kędziora, G. Bartosz: "Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril", Free Radical Biology and Medicine, Vol. 23, No. 5, (1997), 729-735.
- [7] C.G. Zou, N.S. Agar, G.L. Jones: "Oxidative insult to human red blood cells induced by free radical initiator AAPH and its inhibition by a commercial antioxidant mixture", Life Sci. 2001 May 25, 69, (1), 75-86.
- [8] J. Ristein, M. Riedel, F. Maier, B.F. Mantel, M. Stammler, L. Ley: "Surface doping: a special feature of diamond", Journal of Physics: Condensed Matter, 13, (2001), 8979-8987.
- [9] K.J amada: "Shock synthesis of a new cubic form of carbon", Carbon, Vol. 41, No. 6, (2003), 1309-1313.
- [10] Ch.K. Mathews, K.E. van Holde, K.G. Ahern: Biochemistry, An Imprint of Addison Wesley Longman, 2000.
- [11] S. Mitura, K. Bąkowicz: "Bioactivity of diamond", 13 th Conference on Diamond, Diamond - Like Materials, Carbon Nanotubes, Nitrides and Silicon Carbide, Abstract Book, September 2002, Granada, Spain.

74. WETTABILITY OF AS-DEPOSITED AND IMPLANTED TETRAHEDRAL CARBON FILMS

O.M. KUTSAY*, O.I. KAPLUNENKO*, A.G. GONTAR*,
O.B. LOGINOVА*, V.M. PEREVERTAILO*, N.V. NOVIKOV*,
W.Y. LUK**, Y. LIFSHITZ**, I. BELLO*, S.T. LEE**

*V.N.BUKUL INSTITUTE FOR SUPERHARD MATERIALS OF THE
NASU,
2 AVTOZAVODSKA VUL., KYIV 74, UKRAINE

**CENTER OF SUPER-DIAMOND AND ADVANCED FILMS,
CITY UNIVERSITY OF HONG KONG,
83 TAT CHEE AVENUE, KOWLOON, HONG KONG SAR, CHINA

Abstract

Growing and clustering the sp^2 bonded carbon fraction in the tetrahedral carbon (ta-C) films by ion implantation is confirmed by Raman spectral analysis. The examination of the film transforming evolved on an atomic scale indicates the formation of structures with the higher degree of order. The graphitic basal planes are formed preferably in the perpendicular direction to the film surface. The implantation gives the change in measured values of the contact angle, which can vary from original near 70° for as deposited films to about 60 degrees for implanted films. The implanted tetrahedral carbon films display very similar surface properties at the quite different bulk structure.

Keywords: wettability, tetrahedral amorphous carbon, ion implantation

[Engineering of Biomaterials, 43-44, (2005), 74-75]

Introduction

The wettability plays an important role in many biological and technological processes. Thus, the knowledge of the carbon film surface properties can be helpful to search the possibility of their wide range of application. In terms of possible medical or biological applications, tetrahedral amorphous carbon (ta-C) films can be structured [1] or plasma treated [2] by precision ion implantation or different ion bombardment at proper ion energies and doses to novel nanostructures and surface properties possessing the properties of interest. It is fact that from a new approach to the estimation of protective properties of amorphous hydrogenated carbon films by solution of different physicochemical composition was reported in [3] to the lot of latest related papers we can not present the complete theory of carbon film interaction with a medium. Now it is necessary to receive more experimental results for different types of contact systems.

The main purpose of this work was the determination of the surface properties variations due to tetrahedral carbon films structural transforming. The motivation for this investigation is further inside and understanding of the ion implantation or vacuum treatment effects on the ta-C film surface properties.

Materials and methods

The wettability of as-deposited and implanted tetrahedral carbon (ta-C) films has been studied by measuring the contact angles using the sessile drop method for distilled water and biosolution (0.9% NaCl in distilled water) at 20°C. For such system, the contact angle measurements were repeated a few times. The precision of the contact angle measurements are about 2°. The ta-C films were deposited by a filtered cathodic vacuum arc (FCVA) and subsequently implanted by carbon ion beams extracted from a metal vapor vacuum arc (MEVVA) ion source. The films have been implanted to doses ranging from 10^{15} to 10^{17} ions/cm² at the ion energy within a range of 25 to 50 keV. The FCVA system and MEVVA ion source was operated at about 10⁻⁴ Pa in a pulse regime. The pulse width and repetition rate were 1 ms and 3-7 Hz, respectively. The implantation was carried out at an ion current density of 2.5 μ A/cm² over an area of 200 cm². All the tested films have been oxidized only naturally. Raman spectra were recorded by a Renishaw micro-Raman spectrometers which uses argon laser with the 514.5 nm excitation line. Laser beam transmitted via an microscope objective with 50 × magnification was restricted to maximum 10 mW in order to minimize a possible beam heating effect and consequential atomic reconstruction. A Digital Instrument (USA) atomic force microscope (AFM) was used to study variations of the surface morphology of ta-C film.

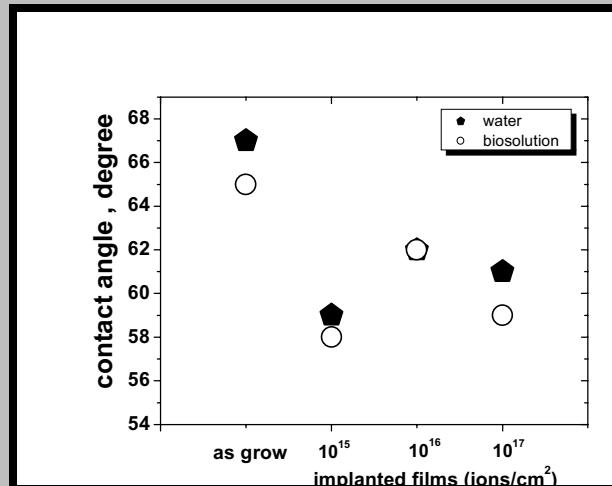
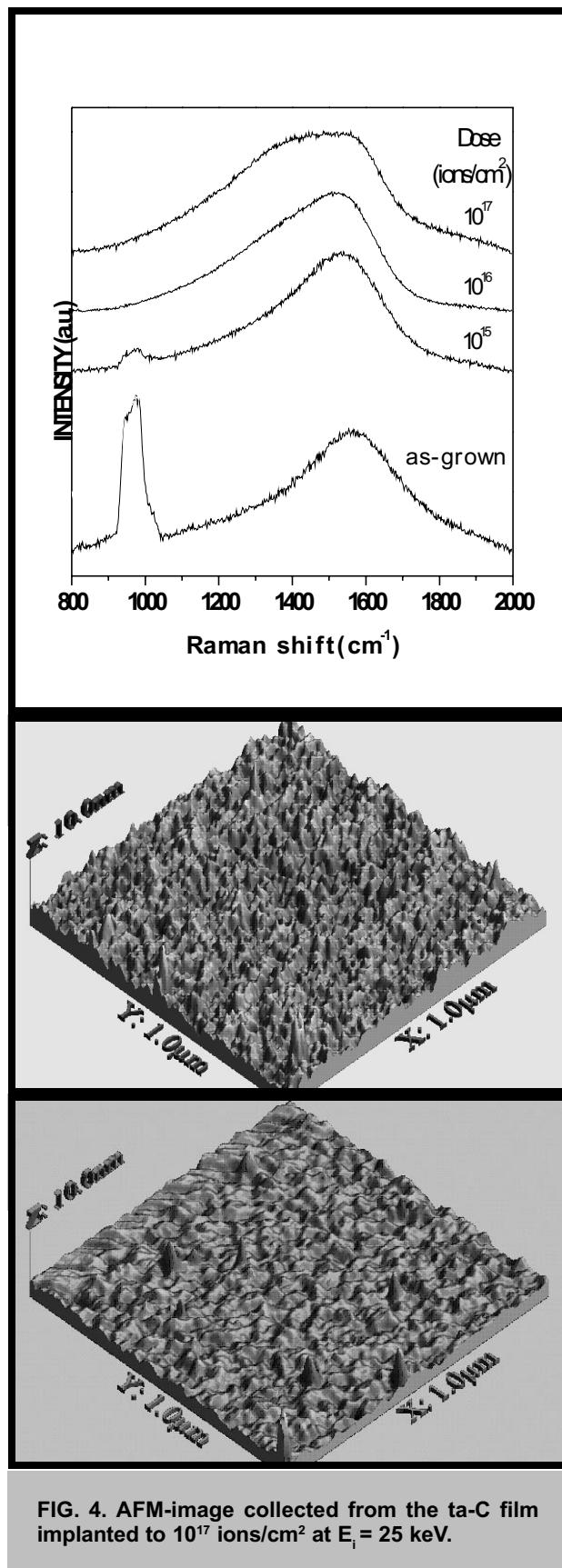


FIG. 1. Wettability of as-deposited and implanted ta-C films.

Results and discussions

The contact angle measurement result of both the implanted to different carbon ion doses and as grown ta-C films are shown in FIG. 1. The all implanted samples give a demonstration of similar capillary characteristics. The average value of contact angle equals to about 60°. We must note that the measurements have error bar scale about 2 degree.

The analysis of Raman spectra in FIG. 2 indicates that originally abundant sp^3 carbon atomic bonding of ta-C is gradually converted to a graphitic phase during the course of ion bombardment. The local order, growth and clustering the sp^2 bonded carbon atoms in the ta-C films by ion implantation is also indicated by Raman spectroscopy. However, the analysis of implanted amorphous carbon films on an atomic scale [1, 4] shows the formation of structure with



the higher degree of order. The graphitic basal planes are formed preferably along the ion tracks.

Surface morphologies of the ta-C before and after implantation are shown in FIG. 3 and FIG. 4. The quantitative parameters of the roughness (according to the ASME B46.1 standard) were obtained from statistical analysis of the frontal image for the scanning area of 1.0×1.0 m. After the ta-C implantation the film root-mean-square (RMS) roughness was reduced from 0.9 to 0.7 nm. This is indicative of the ability of ionic bombardment to reduce the roughness of a film surface.

The treatment by vacuum drying increases the mean values of wetting angles. This means that water adsorbed on the carbon film surface affects the adhesion forces.

Thus, it is possible to see the following due to analyzing the plenty of experimental results. By the possible reason of essential difference in the characteristics as-deposited and implanted film can be concluded in sub-plantation growth nature. The initial films have few graphitic atomic layers on a surface. The carbon ion implantation transforms this layer. Indirect evidence for it confirms AFM measurement for both types of film. Unequivocally it is possible also to approve by Raman analysis, that implanted film have rather different structure. It not affected on their surface properties.

Conclusions

The above experimental results confirms that the orientation of basal planes parallel to the normal of sample surface is not associated with the change in measured values of the contact angle but is rather related to the ion beam treatment of film surface or surface functional groups. The detailed structural analysis and capillary characteristics measurements suggest that the implanted tetrahedral carbon films have very similar surface properties at the quite different bulk structure. It can display that the chemical nature of carbon film surface functional groups calls for further investigation.

References

- [1] O. Kutsay, I. Bello, Y. Lifshitz, C.W. Lam, W.Y. Luk, S.T. Lee, X. Meng, V. Kremnican: Nanostructuring of tetrahedral carbon films by carbon ion implantation // Diamond Relat. Mater. 12 (2003) 2051.
- [2] B.K. Tay, D. Sheeja, S.P. Lau, J.X. Guo: Study of surface energy of tetrahedral carbon films modified in various gas plasma // Diamond Relat. Mater. 12 (2003) 2072.
- [3] N.V. Novikov, S.I. Khandozhko, V.M. Perevertailo, L.Yu. Ostrovskaya, A.G. Gontar, O.B. Loginova: The wettability of a-C:H films by solution of different physicochemical composition // Diamond Relat. Mater. 9 (1998) 1263.
- [4] W.Y. Luk, O. Kutsay, I. Bello, Y. Lifshitz, C.W. Lam, S.T. Lee, X. Meng: Transformation of semiconducting tetrahedral carbon films to semimetal nanocomposite materials by ion implantation // Diamond Relat. Mater. 13 (2004) 1427.



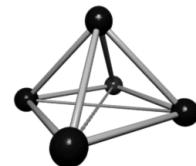
AKADEMIA GÓRNICZO - HUTNICZA

im. Stanisława Staszica w Krakowie

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI

30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30

www.ceramika.agh.edu.pl

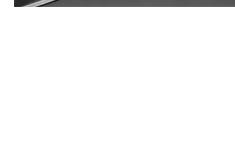
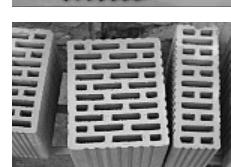


Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki to jednostka akademicka kształcąca w sposób kompleksowy specjalistów z zakresu technologii ukierunkowanych na materiały nieorganiczne i niemetaliczne, tradycyjnie reprezentujące przemysł ceramiczny, materiałów budowlanych oraz nowych tworzyw i technologii materiałów specjalnych.
Jako jedyny tego typu Wydział w kraju zajmuje własne, indywidualne miejsce w środowisku akademickim i naukowym oparte na ponad 50-letniej tradycji.

KIERUNKI KSZTAŁCENIA:

• Technologia Chemiczna

Specjalności: Ceramika i szkło
Materiały budowlane
Materiały dla ochrony i kształtowania środowiska
Analityka i kontrola jakości



• Inżynieria Materiałowa

Specjalności: Biomateriały i kompozyty
Materiały ceramiczne
Materiały dla elektroniki
Ochrona przed korozją



FORMY KSZTAŁCENIA:

- studia dневные инженерские (4 года)
- дневные магистерские (5 лет)
- дневные магистерские узкоспециализированные (2 года)
- заочные инженерские (4,5 лет)
- заочные инженерские – Земельный Центр Образовательно-Научного Центра в Болеславце и Опочно (4,5 лет)
- заочные магистерские узкоспециализированные (2 года)
- докторантуры (4 года)
- постдипломовые

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW

Wskazówki dla autorów

Prace do opublikowania w czasopiśmie "Inżynieria Biomateriałów" będą przyjmowane wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski.

Prosimy je nadsyłać na dyskietkach wyłącznie w formacie Word 6.x (lub wyższy) wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

Możliwe jest również dołączanie ilustracji w różnych formatach grafik typu .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Rozmiar artykułu:

- przeglądownego i pracy oryginalnej - do 10 stron standardowego maszynopisu,
- komunikatu - do 5 stron,
- noty technicznej - do 3 stron

Obowiązuje układ jednostek SI.

Rysunki, tabele i równania powinny być kolejno ponumerowane.

Struktura artykułu:

- streszczenie (do 200 słów),
- słowa kluczowe (3-10 słów),
- wprowadzenie,
- materiał i metodyka,
- wyniki,
- dyskusja,
- wnioski,
- piśmiennictwo (wg systemu Harvard).

Odrońniki literaturowe w tekście należy podawać jako kolejne liczby arabskie w nawiasach kwadratowych.

Pismo (zawierające nazwiska autorów i skróty ich imion, tytuł artykułu, tytuł czasopisma, tom, rok w nawiasach okrągłych i strony) powinno być zamieszczone na końcu artykułu. Skróty tytułów czasopism należy unikać bądź podawać zgodnie z Chemical Abstract. Cytując książki należy podawać numery odpowiednich rozdziałów.

Nie przewiduje się wypłacania honorariów autorskich.

Prace należy nadsyłać na adres:

Redakcja "Inżynieria Biomateriałów"
Akademia Górnictwa - Hutnicza
Katedra Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
fax. (48-12) 617-33-71
tel. (48-12) 617-22-39
e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Warunki prenumeraty

Wydawnictwo Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie przyjmuje zamówienia na prenumeratę, która może obejmować dowolny okres, w którym wydawane są kolejne zeszyty. Zamawiający otrzyma zaprenumerowane zeszyty poczawszy od daty dokonania wpłaty. Zamówienia wstecz będą realizowane w miarę posiadanych zapasów.

Realizacja zamówienia

Warunkiem realizacji zamówienia jest otrzymanie z banku potwierdzenia dokonania wpłaty przez prenumeratora.

Konto

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Należy podać swój adres, tytuł czasopisma, okres prenumeraty i liczbę zamawianych egzemplarzy.

Opłata

Cena jednego numeru - 20 PLN

Instructions to authors

Contributions in English language version should be submitted to:

Editorial Office

"Engineering of Biomaterials"
AGH University of Science and Technology
Department of Biomaterials,
Al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków, Poland
fax. (48-12) 617-33-71, tel. (48-12) 617-22-39
e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Texts should be delivered on a 3.5-inch diskette, accompanied by a printout (with a double spacing) including drawings, photographs, tables etc. Recommended is IBM-compatible MS format, e.g. Word 6.x (or higher). Illustrations can be enclosed on diskettes in the formats: .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Advised paper length is:

- review papers and accounts of original unpublished research - up to 10 pages (standard manuscript pages);
- short communications - up to 5 pages;
- technical notes - up to 3 pages.

SI units should be used in the text.

Figures, Tables and Equations should be numbered in corresponding consecutive series of the Arabic numbers.

Layout of the paper should be the following:

- Abstract (up to 200 words)
- Key words (3-10 words)
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References

References should be made in the text by using consecutive Arabic numbers in brackets. Full references (including author's surname and abbreviated names, title of the paper, title of the journal, volume, year in parenthesis and pages) should be given in a list at the end of the paper. Abbreviations of journal titles should be avoided or used in accordance with those listed in Chemical Abstracts. Whenever a book is cited, the number of the relevant chapter should be given.

The journal makes no page charges.

Subscription terms

Subscription orders should be addressed to the Polish Society for Biomaterials in Kraków.

The ordered issues will be delivered consecutively starting from the date of payment, acknowledged by the bank.

Earlier issues will be supplied if available.

Subscription rates:

Cost of one number - 20 PLN

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials,
Al. Mickiewicza 30/A-3,
30-059 Kraków, Poland
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

It is requested to quote the subscriber's name, title of the journal, desired subscription period and number of the ordered copies.