

Number 67-68 Numer 67-68

Volume X Rok X

DECEMBER 2007 GRUDZIEŃ 2007

ISSN 1429-7248

PUBLISHER: WYDAWCA:

Polish Society for Biomaterials in Cracow Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

EDITORIAL COMMITTEE: KOMITET REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief Redaktor naczelny Jan Chłopek

Secretary of editorial Sekretarz redakcji Katarzyna Trała

Design Projekt Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

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

Issue: 200 copies Nakład: 200 egz.

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



INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac University Politehnica of Bucharest, Romania

LUCIE BACAKOVA Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Romuald Będziński Politechnika Wrocławska / Wrocław University of Technology, Poland

Marta Blażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland

Stanisław Błażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland

Maria Borczuch-Łączka Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland

TACIEUSZ CIEŚLIK Śląska Akademia Medyczna / Medical University of Silesia, Poland

Jan Ryszard Dąbrowski Politechnika Białostocka / Białystok Technical University, Poland

Andrzej Górecki Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw, Poland

Robert Hurt Brown University, Providence, USA

James Kirkpatrick Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

Małgorzata Lewandowska-Szumieł Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw, Poland

Jan Marciniak Politechnika Śląska / The Silesian University of Technology, Poland

Sergey Mikhalovsky University of Brighton, Great Britain

Stanisław Pielka Akademia Medyczna we Wrocławiu / Wrocław Medical University, Poland

Jacek Składzień Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków/UJ, Collegium Medicum, Cracow, Poland

Anna Ślósarczyk Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow, Poland

Tadeusz Trzaska AWF, Poznań / University School of Physical Education, Poznań, Poland

Dimitris Tsipas Aristotle University of Thessaloniki, Greece

XVIII Conference on

BIOMATERIALS IN MEDICINE

VETERINARY

AND

MEDICINE

October, 9-12,2008 Hotel "Perla Poludnia", Rytro,

http://galaxy.uci.agh.edu.pl/~apowroz/biomat/



SPIS TREŚCI

IMPROVED ADHESION AND GROWTH OF VASCUI SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON POLYETHYLENE MODIFIED BY PLASMA DISCHARGE M.Parizek, N.Kasalkova, L.Bacakova, K.Kolarova, V.Lisa, V.Svorcik	LAR 1	IMPROVED ADHESION AND GROWTH OF VASCUL SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON POLYETHYLENE MODIFIED BY PLASMA DISCHARGE M.Parizek, N.Kasalkova, L.Bacakova, K.Kolarova, V.Lisa, V.Svorcik	LAR 1
HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH ZIRCONIUM NITRIDE J.Paul, L.Bacakova, M.Douderova, V.Stary, J.Vyskocil, V.Lisa, A.Slosarczyk, A.Zima	5	HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH ZIRCONIUM NITRIDE J.PAUL, L.BACAKOVA, M.DOUDEROVA, V.STARY, J.VYSKOCIL, V.LISA, A.SLOSARCZYK, A.ZIMA	5
BADANIA NAD SYNTEZĄ I WŁAŚCIWOŚCIAMI WIELOFUNKCYJNYCH MONOMERÓW URETANOWO-METAKRYLOWYCH DO KOMPOZYCJI DENTYSTYCZNYCH M.Biernat, G.Rokicki, M.Szafran, A.Cwalińska	9	RESEARCH ON THE SYNTHESIS AND PROPERTIE OF MULTIFUNCTIONAL URETHANE-METHACRYLI MONOMERS FOR DENTAL COMPOSITIONS M.BIERNAT, G.ROKICKI, M.SZAFRAN, A.CWALIŃSKA	≣S IC 9
OCENA PORÓWNAWCZA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH ODBIAŁCZONEJ KOŚCI LUDZKIEJ I JEJ MIESZANINY Z BIOSZKŁEM – BADANIA WSTĘPNE NA ZWIERZĘTACH J.Nocoń, M.Cieślik, J.Rauch, M.Łączka, B.Rauch, T.Cieślik	12	COMPARATIVE EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF DEPROTEINIZED HUMAN BONE AND ITS MIXTURE WITH BIOGLASS-PRELIMINARY EXAMINATION PERFORMED ON ANIMALS J.NOCOŃ, M.CIEŚLIK, J.RAUCH, M.ŁĄCZKA, B.RAUCH, T.CIEŚLIK	Y 12
WPŁYW PRZECIĘCIA TKANEK NA WYNIKI BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH KRĄŻKÓW STAWU SKRONIOWO-ŻUCHWOWEGO W.Chladek, I.Czerwika	^ń 16	THE INFLUENCE OF TISSUE INCISION ON THE EXAMINATION RESULTS REGARDING TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISCS' MECHANICAL PROPERTIES W.CHLADEK, I. CZERWIKA	16
PRZECIWBAKTERYJNE WŁAŚCIWOŚCI PROTEZ NACZYNIOWYCH MODYFIKOWANYCH CEFEPIMEM M.Miazga-Karska, G.Ginalska	19	ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF VASCULAR GRAFTS MODIFIED WITH CEFEPIME M.MIAZGA-KARSKA, G.GINALSKA	19
OPTYMALIZACJA WARUNKÓW UNIERUCHAMIA- NIA SPARFLOKSACYNY NA BIOMATERIAŁACH WYKONANYCH Z POLITEREFTALANU ETYLENU M.Miazga-Karska, G.Ginalska, M.Osińska-Jaroszuk	21	OPTIMIZATION OF SPARFLOXACIN IMMOBILIZATION CONDITIONS ON POLY- ETHYLENE TEREPHTHALATE BIOMATERIALS M.MIAZGA-KARSKA, G.GINALSKA, M.OSIŃSKA-JAROSZUK	21
OCENA MOŻLIWOŚCI IMMOBILIZACJI FLUORO- CHINOLONÓW DO POLITEREFTALANU ETYLENU M.Osińska-Jaroszuk, G.Ginalska, M.Miazga-Karska	23	ESTIMATION OF POSSIBILITY OF FLUORO- QUINOLONE ANTIBIOTICS IMMOBILIZATION TO POLYETHYLENE TEREPHTHALATE M.Osińska-Jaroszuk, G.Ginalska, M.Miazga-Karska	23
ANALIZA MECHANICZNO-ELEKTROCHEMICZNA ANODOWEJ WARSTWY WIERZCHNIEJ NA STOPIE TI6AI4V ELI A.Kierzkowska, E.Krasicka-Cydzik	25	MECHANICAL AND ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF ANODIC SURFACE LAYER ON TITANIUM ALLOY TI6AI4V ELI A.Kierzkowska, E.Krasicka-Cydzik	25
	- I	WVD AND DODINANSONANE BRZEZ MINISTRA NAUKA	

STRESZCZANE W APPLIED MECHANICS REVIEWS Abstracted in Applied Mechanics Reviews

I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO Edition financed by the Minister of Science and Higher Education

CONTENTS

C r Ш ш 🇰

 • • • • • • •	WPŁYW PIERWIASTKÓW STOPOWYCH NA ZACHOWANIE SIĘ WARSTWY ANODOWEJ		THE INFLUENCE OF ALLOY ELEMENTS ON THE BEHAVIOUR OF THE ANODIC	
	NA IMPLANTOWYCH STOPACH TYTANU W ŚRODOWISKU KWASU FOSFOROWEGO E.Krasicka-Cydzik, I.Głazowska	29	LAYER ON IMPLANT TITANIUM ALLOYS IN PHOSPHORIC ACID SOLUTIONS E.Krasicka-Cydzik, I.Głazowska	29
	ANALIZA NUMERYCZNA PŁYT DO LECZENIA LEJKOWATEJ KLATKI PIERSIOWEJ A.Krauze, J.Marciniak	32	NUMERICAL ANALYSIS OF PLATES USED IN FUNNEL CHEST TREATMENT A.Krauze, J.Marciniak	32
	MECHANICZNE I FIZYKO-CHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI WARSTW TIO J.Krzak-Roś, D.Grygier, A.Baszczuk, R.Będziński	35	MECHANICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF TITANIUM DIOXIDE THIN FILMS J.Krzak-Roś, D.Grygier, A.Baszczuk, R.Będziński	35
	SUPERSPRĘŻYSTE IMPLANTY NITI DLA CIĄGŁEJ DYSTRAKCJI KOŚCI Z.Lekston, D.Stróż , H.Morawiec	38	SUPERELASTIC NITI IMPLANTS FOR CONTINUOUS BONE DISTRACTION Z.Lekston, D.Stróż , H.Morawiec	38
	ZMIANA ODPORNOŚCI KOROZYJNEJ MATERIAŁÓW PO OBRÓBCE POWIERZCHNIOWE, DLA ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH K.Mendzik, M.Lubas, J.Jasiński, L.Jeziorski, M.Szota	, 42	CORROSION RESISTANCE CHANGES OF MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLCATIONS AFTER SURFACE TREATMENT K.Mendzik, M.Lubas, J.Jasiński, L.Jeziorski, M.Szota	42
	MODELOWANIE ZA POMOCĄ SZTUCZNYCH SIECI NEURONOWYCH ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI WARSTWY WIERZCHNIEJ BIOMATERIAŁÓW M.Szota, J.Jasiński, L.Jeziorski, M.Lubas	45	MODELING CHANGES OF PROPERTIES OF SURFACE LAYER OF BIOMATERIALS BY MEANS ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS M.Szota, J.Jasiński, L.Jeziorski, M.Lubas	45
	BIOAKTYWNA SZKŁO – CERAMIKA NOWEJ GENERACJI JAKO SUBSTYTUT KOŚCI – BADANIA W WARUNKACH <i>IN VIVO</i> K.Niedzielski, R.Sindut, K.Cholewa–Kowalska, M.Łączka, J.Kokoszka	48	NEW GENERATION BIOACTIVE GLASS- CERAMICS AS A SUBSTITUTE OF BONE – <i>IN VIVO</i> STUDY K.Niedzielski, R.Sindut, K.Cholewa–Kowalska, M.Łączka, J.Kokoszka	48
	WPŁYW ŚREDNICY WŁÓKIEN WĘGLOWYCH NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ I.Rajzer, M.Błażewicz, E.Menaszek, A.Czarny, E.Zaczyńska	52	THE EFFECT OF THE CARBON FIBRES DIAMETER ON CELL RESPONSE I.Rajzer, M.Błażewicz, E.Menaszek, A.Czarny, E.Zaczyńska	52
	AREOLOGIA NIEKONWENCJONALNEGO AZOTOWANIA JARZENIOWEGO STALI AUSTENITYCZNYCH (304 I 316L) T.Frączek, Z.Paszenda, Z.Nitkiewicz, M.Gwoździk, M.Basiaga	57	AREOLOGY OF UNCONVENTIONAL PLASMA NITRIDING OF AUSTENITIC STEELS (304 AND 316L) T.Frączek, Z.Paszenda, Z.Nitkiewicz, M.Gwoździk, M.Basiaga	57

ш**U**_0 MATERIAG Ċ

||

•

IMPROVED ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON POLYETHYLENE MODIFIED BY PLASMA DISCHARGE

Martin Parizek¹, Nikola Kasalkova², Lucie Bacakova^{1,} Katerina Kolarova², Vera Lisa¹, Vaclav Svorcik²

 ¹ INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD. SCI. CR, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC,
 ² INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, TECHNICKA 5, 166 28 PRAGUE 6 – DEJVICE E-MAIL: PARIZEK.M@SEZNAM.CZ

Abstract

The attractiveness of synthetic polymers for cell colonization can be affected by physical and chemical modification of the polymer surface. In this study, high density polyethylene (HDPE, m.w. 0.952g/cm3) and low density polyethylene (LDPE, m.w. 0.922g/cm³) were modified by an Ar plasma discharge using Balzers SCD 050 device (exposure time 10, 50, 150 and 400 seconds, discharge power 1.7W). The material was then seeded with rat aortic smooth muscle cells (RASMC; passages 8 to 9, 17 000 cells/cm²) and incubated in a DMEM medium with 10% of fetal calf serum. On day 1 after seeding, the number of initially adhered cells was significantly higher on all modified HDPE and LDPE samples. On day 2, this difference persisted in HDPE, whereas in LDPE only the values on the samples modified by 150 and 400 seconds were significantly higher. On the 5th and 7th day, there were no significant differences in cell number among all LDPE samples. However, on the HDPE foils, significant differences were still apparent on the samples modified for 400 seconds. The cell spreading areas measured on day 1 after seeding were significantly larger on all modified LDPE samples, and, on day 2, on the HDPE samples exposed for 150s. The increased cell colonization was probably due to the formation of oxygen-containing chemical functional groups in the polymer. These results suggest that the responsiveness of the cell to the changes in physicochemical surface properties was more pronounced in HDPE than in LDPE. On both types of polyethylene, the most appropriate exposure time for the enhancement of cell adhesion and growth seemed to be 150 and 400 seconds.

Keywords: Ar plasma discharge, high density and low density polyethylene, cell adhesion, cell proliferation, vascular smooth muscle cells, biomaterials, tissue engineering.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 1-4]

Introduction

Synthetic polymers, such as polyethylene, polystyrene, polyurethane, polytetrafluoroethylene and polyethylene terephtalate, are commonly used in various industrial applications as well as in biology and medicine. They not only serve as growth supports for cell cultures *in vitro*, but can also be used for constructing replacements for various tissues or organs, e.g. non-resorbable or semi-resorbable vascular prostheses, artificial heart valves, bone and joint replacements, and implants for plastic surgery (for a review see Bacakova et al. 1996, 2000, 2001).

There are two approaches to the application of these materials. The first approach uses highly hydrophobic or extremely hydrophilic surfaces, which do not allow adhesion and growth of cells. This approach is used for creating bioinert vessel replacements, where permanent blood flow is necessary and thus the adhesion of thrombocytes or immunocompetent cells is not desirable, due to the risk of restenosis of the graft (for a review see Bacakova et al. 2000). An alternative approach, widely accepted in recent tissue engineering, is to create surfaces that support colonization with cells and good integration of a replacement with the surrounding tissues of the patient's organism. This concept is used e.g. for constructing bone prostheses that will persist in the patient's organism for many years, and is being developed for the creation of bioartificial replacements of blood vessels, liver, pancreas and even nervous tissue (for a review see Bacakova et al. 2000, 2001).

There are various ways of modifying the surfaces of the materials to make them convenient for cell adhesion. For this purpose, the surfaces have been exposed to ultraviolet (UV) irradiation (Svorcik et al. 2004), to a beam of ions (e.g., oxygen, nitrogen, noble gases or halogens for biological applications; Bacakova et al. 1996, 2000, 2001) or to a plasma discharge (Turos et al 2003). For more pronounced changes in the physicochemical properties of the modified surface, some of these processes can be realised in a gas atmosphere, e.g. in acetylene or ammonia (Svorcik et al. 2004). The goal of these irradiation modifications is to create functional chemical groups containing oxygen or nitrogen, like carbonyl, carboxyl or amine groups, on the surface of the material. These groups increase the surface wettability, support the adsorption of cell adhesion-mediating extracellular matrix proteins and stimulate the cell adhesion and growth (Bacakova et al. 1996, 2000, 2001, Svorcik et al. 2004). In this study, we used an Ar plasma discharge for surface modification of high- or low-density polyethylene, i.e. materials that are promising for biomedical use. On the modified polymers, we evaluated the colonization with smooth muscle cells in cultures isolated from the rat aorta.

Materials and methods

Preparation of the polymer samples

High density polyethylene (HDPE, m.w. 0.952g/cm³) and low density polyethylene (LDPE, m.w. 0.922g/cm³), which are model materials for the potential development of tissue replacements, were modified by an Ar plasma discharge (gas purity: 99.997%) using a Balzers SCD 050 device for 10, 50, 150 and 400 seconds; the discharge power was 1.7 W.

Cells and culture conditions

The modified materials were cut into square samples 10x10mm in size, placed into 24-well plates (TPP, Switzerland; well diameter 1.5cm) and fixed to the well bottom by polyethylene circles (inner diameter 0.7cm, inner area 0.38465cm²). Vascular smooth muscle cells were isolated by an explantation method from the aorta of young male rats of the strain Wistar SPF (Bacakova et al. 2000, 2001). In the 8th to 9th passage, the cells were seeded on the samples at a density of 30,000 cells/well (i.e., 17,000 cells/cm²). The cells were cultivated in 1.5ml of Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma, U.S.A.) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sebak GmbH,

Aidenbach, Germany) for 1, 2, 5 and 7 days (temperature of 37° C, 5% of CO₂ in a humidified air atmosphere). The cells were then fixed by 70% cold ethanol (-20°C) and stained with hematoxylin and eosin. The number of cells on the sample surface was evaluated on pictures taken under an Olympus IX 50 microscope using an Olympus DP 70 digital camera. The cell spreading areas were determined using Atlas software (Tescan Ltd., Brno, CR). As control materials, non-modified polymers, pristine polystyrene foils and standard tissue culture polystyrene dishes were used.

Statistics

The results were presented as mean \pm S.E.M. (Standard Error of Mean). Statistical significance was evaluated by Student's t-test for unpaired data. Values p≤0.05 were considered as significant.

Results and discussion

On the first day after seeding, the numbers of cells on the HDPE samples were significantly higher on all modified foils than on the pure HDPE, and on both types of polystyrene. The highest average cell number, amounting to 13,560±740 cells/cm², was found on the sample modified with plasma discharge for 150s. The lowest number of cells was detected on the sample modified with 50s plasma discharge, where we observed only 110726±804cells/cm² (FIG.1). Similarly, on the LDPE samples, the numbers of cells on day 1 after seeding were also higher on all modified samples in comparison with the pure LDPE and the tissue culture polystyrene dishes. The highest value of 13,530±1,460cells/cm² was reached on the sample modified for 150s, and the lowest cell number of 11140±1350cells/cm² was observed on the sample modified for a relatively short time interval of 10s (FIG.2).

On day 2 after seeding, the cell numbers on all modified HDPE samples continued to be significantly higher than those on the pristine HDPE (FIG.1). However, on the LDPE foils the cell numbers were significantly higher only on the samples modified at longer exposure times. The lowest cell number of 17,200 \pm 1,960 cells / cm², similar to that found on pure LDPE (18,455 \pm 19,08cells/cm²), was observed on the sample modified for 10s. On the sample modified for 50s, the cell number was 22,030 \pm 2,340cells/cm², which was still non-significant in comparison with the pristine LDPE. Only on the samples modified for 150 and 400s did the cells reach significantly higher numbers of 26,650 \pm 2,300 and 26,750 \pm 1,800cells/cm², respectively (FIG.2). Therefore, the cell number showed a tendency to increase with the time of exposure to the plasma discharge.

On the 5th day, the cell populations densities on the HDPE were similar in the case of samples modified for 10, 50s and pure HDPE, pure polystyrene and culture dish polystyrene. Significantly higher values were found only on the samples modified for 150 and 400s 71,950 \pm 2,870 and 63,695 \pm 4,873 cells/cm², respectively). On the LDPE samples the situation was different. The numbers of cells were similar on all samples except for the sample irradiated for 10s, where the cell population density was significantly higher, reaching 151,600 \pm 6,020cells/cm² (FIG.1,2).

On the 7th day, the numbers of cells on HDPE were significantly higher on all modified samples than on the pure HDPE, and the average cell number increased with the exposure time. Thus, the highest average value of 79,020±6,800cells/cm² was found on the sample modified for 400s, whereas the lowest cell population density of 43,090±5,840cells/cm² was obtained on the pure HDPE foil. On all LDPE samples, the numbers of cells were similar and without any statistical variances.



FIG.1. Number of rat aortic smooth muscle cells on day 1, 2, 5 and 7 after seeding on HDPE modified by an Ar plasma discharge. PS = pure polystyrene, PSC = polystyrene culture dish. Mean \pm SEM from 20 microscopic fields (0.144 mm²) obtained from 2 independent samples for each experimental group. Student's t-test for unpaired data. Statistical significance (p≤0.001 etc.) was evaluated in comparison with control unmodified HDPE.



FIG.2. Number of rat aortic smooth muscle cells on day 1, 2, 5 and 7 after seeding on LDPE modified by an Ar plasma discharge. PS - pure polystyrene, PSC - polystyrene culture dish. Mean \pm SEM from 20 microscopic fields (0.144 mm²) obtained from 2 independent samples for each experimental group. Student's t-test for unpaired data. Statistical significance (p≤0.001 etc.) was evaluated in comparison with control unmodified HDPE.

The results obtained on cell numbers indicate that the sensitivity of the cells to the changes in the physicochemical properties of the polymer surface was more pronounced in HDPE than in LDPE: thus the improvement of the colonization with cells was more apparent on HDPE. However, the cells were better spread on the LDPE foils. On day 1 after seeding, the cell spreading areas were significantly larger on all modified LDPE samples, ranging from 891±65 to1,462±142µm², compared to the values on the nonmodified polymer (1,175±77µm²), though on day 2 after seeding these differences disappeared. In contrast, on all HDPE samples the cell spreading areas were similar (from 205±29µm² to 453±46µm²) and, surprisingly, they were relatively small in comparison with those found on the tissue culture polystyrene (546±89µm² respectively). Only on day 2 after seeding was a significantly larger adhesion area found in cells grown on HDPE modified with plasma discharge for 150s (992±52um²).

Nevertheless, the cells were able to form a confluent layer on all samples except for the pure HDPE. In the non-modified form, the material was not a good substrate for cell adhesion and growth, which may have been due to its relatively high hydrophobicity (water drop contact angle 102.5±2.3°; Svorcik et al. 2006). Pristine LDPE was more wettable (water drop contact angle 96.6±1.9°) and thus more permissive for cell adhesion. The improved cell adhesion and growth of cells on samples modified by plasma discharge was probably due to the creation of oxygen-containing functional groups. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) has indicated the presence of peroxide, ester, carbonyl, carboxyl, hydroxyl, amide groups and excessive double bonds in polyethylene modified with a plasma discharge (Svorcik et al. 2006). The oxygen-containing groups are known to increase the surface wettability and improve the adsorption of cell adhesion-mediating extracellular matrix molecules (e.g. vitronectin, fibronectin) from the serum of the culture medium. These molecules are adsorbed in an appropriate





amount, flexibility and spatial conformation enabling good accessibility of specific sites on these molecules (e.g., RGD-containing amino acid sequences) by cell adhesion receptors, such as integrins (Bacakova et al. 1996, 2000, 2001). The cell adhesion and growth on polymers modified by plasma discharge could be further improved by functionalization of the oxygen-containing and other groups formed on the material surface by amino acids or oligopeptides acting as ligands for cell adhesion receptors and recognized preferentially by vascular smooth muscle cells, such as KQAGDV or VAPG (Mann and West 2002).

Conclusion

Treatment of high- and low-density polyethylene with an Ar plasma discharge increased the population density of vascular smooth muscle cells in cultures on these materials. This effect showed a tendency to be positively correlated with the time of Ar plasma discharge, and was more pronounced in relatively highly hydrophobic HDPE than in more wettable LDPE. However, on the modified LDPE, the cells adhered by a significantly larger spreading area. The improvement of the cell colonization was probably due to the formation of oxidized structures in the polyethylene surface layer and increased material wettability. Thus, plasma discharge proved to be a suitable method for modifying hydrophobic polymer surfaces designed for the construction of tissue replacements, e.g. bioartificial vascular prostheses. This approach deserves further investigation, especially as regards further functionalization of the polymers with bioactive molecules.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of the Acad. Sci. CR (grant No. A 5011301). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for the language revision of the manuscript.

References

[1] Bacakova L., Svorcik V., Rybka V., Micek I., Hnatowitz V., Lisa V., Kocourek F.: Biomaterials 17: 1121-1126, 1996.

[2] Bacakova L., Mares V., Bottone M. G., Pellicciari C., Lisa V., Svorcik V.: J. Biomed. Mater. Res. 49: 369-379, 2000.

[3] Bacakova L., Walachova K., Svorcik V., Hnatowitz V.: J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 12: 817-834, 2001.

[4] Bacakova L., Noskova L., Koshelyev H., Biederman H.: Inzynieria Biomaterialów-Engineering of Biomaterials, 7 [37]: 18-20, 2004.

[5] Mann B.K., West J.L.: J Biomed Mater Res. 60: 86-93, 2002
[6] Turos A., Jagielski J., Piatkowska A., Bielinski D., Slusarski L., Madi N K.: Vacuum, 70: 201-206, 2003.

[7] Svorcik V., Rockova K., Ratajova E., Heitz J., Huber N., Bäuerle D., Bacakova L., Dvorankova B., Hnatowitz V.: Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B 217: 307-313, 2004.

[8] Svorcik V., Kolarova K., Slepicka P., Mackova A., Novotna M., Hnatowicz V.: Polym.Degr. Stab. 91: 1219-1225, 2006.

• • • • • • • • • • • • • • • • •

HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG 63 CELLS IN CULTURES ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH ZIRCONIUM NITRIDE

JOSEF PAUL^{1,2}, LUCIE BACAKOVA², MARGITA DOUDEROVA¹, VLADIMIR STARY¹, JIRI VYSKOCIL³, VERA LISA², ANNA SLOSARCZYK⁴, ANETA ZIMA⁴

¹ DEPARTMENT OF MATERIALS ENGINEERING, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, CZECH TECHNICAL UNIVERSITY IN PRAGUE, KARLOVO SQ. 13, 121 35 PRAGUE 2, CZECH REPUBLIC
² DEPT. OF GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CELL POPULATIONS, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4 – KRC, CZECH REPUBLIC
³ HVM PLASMA, NA HUTMANCE 2, 158 00 PRAGUE 5, C.R.
⁴ AGH–UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 CRACOW, POLAND

Abstract

Zirconium nitride is considered as a promising material for strengthening the surface of various materials, especially those designed for hard tissue surgery. In this study, five groups of materials were prepared: non-modified carbon fibre-reinforced carbon composites (CFRC). CFRC ground with metallographic paper, non-ground CFRC with a layer of ZrN deposited by magnetron sputtering, ground CFRC with a ZrN layer deposited by the arc technique, and ground CFRC with a ZrN layer deposited by a magnetron. We found that all samples gave good support for the adhesion and growth of humanosteoblast-like MG 63 cells, though the cell numbers on these materials were often lower than on standard cell culture polystyrene dishes and microscopic glass coverslips. Nevertheless, ZrN films can be considered as suitable materials for surface modification of bone implants in order to improve their mechanical properties and their integration with the surrounding tissue.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 5-8]

Introduction

Nowadays ZrN films are increasingly used to improve the physical and chemical surface properties of substrates, especially if the surfaces are under considerably high mechanical stress [1]. ZrN films have been used in various branches of industry for their excellent mechanical properties (low friction coefficient, wear resistance, hardness), chemical properties (corrosion resistance, resistance to solvents and acids, non-toxicity) and physical properties (high melting point), in order to improve the lifetime and surface gualities of various objects [1]. In the field of biomedicine, namely in bone and joint prostheses, a considerable mechanical stress occurs at the articular surfaces. Excellent resistivity against dynamic load, fatigue and abrasion is therefore needed [1,2]. Prostheses must exert their function in the environment of the surrounding tissues. This is a chemically highly aggressive environment, so corrosive resistivity and biocompatibility of the materials are of crucial importance. The possibility of sterilizing the material in a cold or hot environment must also be preserved. The bio-inert properties of zirconium are already known, and thus this material could be suitable for surface coatings of various body implants [1]. However, relatively little is known about the influence of this type of coating on the adhesion and growth of cells. Therefore, in this study, ZrN films were deposited on the surface of composites with a carbon matrix reinforced with carbon fibres (CFRC), a material promising for bone tissue engineering. The adhesion and proliferation of human osteoblast-like MG 63 cells in cultures on these surfaces was then investigated and correlated with selected physical and chemical properties of these films.

Materials and methods

Preparation of the material

Two-dimensionally reinforced CFRC was prepared at the Institute of Rock Structure and Mechanics, Acad. Sci. CR, Prague. Briefly, commercially available woven fabric made of Toray T 800 carbon fibres was arranged in layers, infiltrated with a carbon matrix precursor (phenolic resin UMAFORM LE, Synpo Ltd., Pardubice, CR), pressed, cured, carbonised at 1000°C, and finally graphitized at 2200°C [3]. The composites were cut into square samples with an edge length of 10mm. They were used either in their pristine unmodified form or they were gradually ground in a fluid environment using metallographic papers with grains of sizes P320, P600, P800, P1000 and P4000 (waterproof abrasive paper, Hermes) in a KOMPAKT 1031 device (MTH Brno, Czech Rep.) at 236 revolutions per minute. The composites were then coated by ZrN films deposited either by magnetron sputtering [4] or by the electrical arc technique [5], which was performed at HVM Plasma Company, Prague, Czech Republic. The following 5 groups of samples were created: Group E: non-modified CFRC

Group F: CFRC ground with metallographic paper

Group D1: non-ground CFRC with a ZrN layer deposited by magnetron sputtering

Group D2: ground CFRC with a ZrN layer deposited by the arc technique

Group D3: ground CFRC with a ZrN layer deposited by magnetron sputtering

As reference materials, microscopic glass coverslips (S, diameter 12mm; Menzel Glaser, Germany) and polystyrene culture dishes (PS, diameter 15mm) were used. The cell growth on ZrN-coated composites was also compared with that on calcium phosphate-based ceramics (H) containing α -tricalcium phosphate (TCP) and hydroxyapatite (HAp). These samples, representing a material used for constructing bone tissue implants [6], were prepared at AGH – University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Cracow, Poland, in the form of pellets 12 mm in diameter and 3mm in thickness.

Evaluation of the physicochemical properties of the material

The surface roughness was measured by a profilometer (Hommelwerke, Standard T1000 Basic, Germany) on each sample before and after seeding the cells. The following parameters were set on the profilometer: sensor type T1E, range of measurement 80µm, sensor length L_c=0.800mm, distance of the sensor movement L_t=4.80mm (FIG.1). On each sample, the parameter R_a (i.e., departures of the roughness profile from the mean line) was measured in 6 cycles, 3 measurements being performed in one direction and 3 measurements. Before cell seeding, 10-13 samples were measured for each experimental group, and after the cell culture procedure, 2 samples were used.

.....



FIG.1. The course of scanning the surface of a ZrN-coated CFRC sample (D3, day 7, R_a =1.26µm) by the T1E profilometer sensor. Upper part: real morphology of the surface, lower part: automatically filtered for extreme values. Note that the relatively smooth surface of the sample contains one greater irregularity, which is probably due to a lost carbon fibre.

Evaluation of cell adhesion and growth on the material

All CFRC samples were cleansed by pure ethanol (96%) in an ultrasonic cleaner before cell seeding. The cleaning time for each sample was about 2 minutes. Then the samples were dried under an infra-red lamp and protected from potential contamination by the surrounding environments. The samples were sterilized in an autoclave, inserted into 24-well multidishes (TTP, Switzerland, well diameter 15mm) and seeded with human osteoblast-like MG 63 cells. Each well contained 15,000 cells (8,492 cells/cm²) and 1.5ml of Dulbecco's modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM; Sigma, U.S.A., Cat. No D5648) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) and gentamicin (40 µg/ml, LEK, Ljubljana, Slovenia). The cells were cultured for 1, 3 and 7 days at 37°C in a cell incubator in a humidified air atmosphere containing 5% of CO₂. For each experimental group and time interval, 3 independent samples were used.

To evaluate the cell morphology, the cells on the samples were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma, U.S.A.), fixed with 70% cold ethanol (-20°C, 5min), stained with a combination of Texas Red C2-maleimide fluorescent cell membrane dye (10ng/ml; Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008) and nuclear dye Hoechst #33342 (5µg/ml, Sigma, U.S.A.) and observed in a conventional fluorescence microscope (Olympus IX 50, equipped with a DP 70 digital camera, Japan) or a confocal microscope DM 2500 (Leica, Germany). The size of the cell adhesion area was evaluated on digital pictures taken from 9 randomly selected microscopic fields (size approx. 1.38•10-3cm²) from one sample for each experimental group, using Atlas software (Tescan Ltd., Brno, Czech Republic). The cells that developed intercellular contacts were excluded from the evaluation. The size of the cell adhesion area was measured only on day 1 after seeding, because in the following days the material surface was already coated with a high number of cells in contact, overlapping each other or even forming multilayered regions.

To evaluate the cell number, two approaches were used. In the first approach, the cells were counted on digital pictures taken from 9 randomly selected microscopic fields (size approx. 1.38•10⁻³cm²) from one sample for each experimental group and time interval. The cell population densities per cm² were used for constructing the growth curves. In the second approach, the cells were detached by a trypsin-EDTA solution (Sigma, U.S.A., Cat. No T4174) at 37°C for 5 to 10 minutes, 0.5 ml/well. The trypsinization was then stopped by adding 0.5 ml of the culture medium. The total cell number and the number of viable cells were then determined in a Cell Viability Analyzer (VI-cell XR, Beckman Coulter) using 2 samples for each experimental group.

To evaluate possible changes in the surface roughness of the samples exposed to cell culturing, the samples were cleaned by brushing in water and exposing to ultra-sound. Together with cell culture, these procedures could be considered to simulate mechanical abrasion of the prosthetic material in the patient's organism, the chemical influence of the liquids in the environment of the human body, as well as the degrading activity of the cells. The surface roughness was then measured by the same approach as described above.

Statistical analysis

The quantitative data was presented as mean ±S.E.M. (Standard Error of the Mean). The statistical significance of the differences among the experimental groups was evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA, Student-Newman-Keuls method), using SigmaStat software (Jandel Corp. U.S.A.). Values p≤0.05 were considered significant.

Results and discussion

As revealed by the measurement of the R_a parameter, CFRC is a relatively rough material, due to the crossing of the carbon fibres in carbon fabrics and also the prominence of the fibres over the carbon matrix. Grinding the surface of CFRC resulted in a statistically significant decrease in the surface roughness, whereas coating with ZrN had no considerable effects on the surface topography (FIG.2). This was probably due to the very low thickness of the ZrN layer, which adhered tightly to the underlying material surface and copied its morphology precisely. Similar effects were observed in CFRC coated with carbon-titanium, the thickness of which was about 1µm [3]. On the other hand, a ZrN coating could strengthen the CFRC surface and thus prevent the potential release of carbon particles from these composites [3]. Interestingly, the cell culture and cleaning procedures, considered as a model of the potential mechanical abrasion of the material in the human body, did not change the R_a parameter significantly for all surface modifications studied.



FIG.2. Roughness parameter Ra before and after cell culture procedure. Mean \pm S.E.M. from 6 to 20 measurements performed on 2 to 10 samples for each experimental group. ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Statistical significance: E, F, D1, D2, D3: p≤0.05 in comparison with the sample of the same label (see Material and methods). This result suggests relatively high stability of our newlydeveloped materials in biological environments and their resistivity against mechanical stress.

Surprisingly, the significant differences in the surface roughness did not influence the population density of cells adhering to and growing on the studied CFRC samples on day 1 and 3. The cell numbers on the non-ground and ground CFRC samples were similar, and on day 1 after seeding, they were also comparable to the values found on standard cell culture surfaces, represented by a polystyrene culture dish and microscopic glass coverslips (FIGs. 3 and 4). These results differed from our earlier findings on higher cell numbers of MG 63 and vascular smooth muscle cells on smoother CFRC surfaces [3]. In the present study, the cells on day 1 after seeding only showed a tendency to be better spread on smoother surfaces, but this difference was not significant (FIG.5). On the other hand, a positive influence of surface microroughness on colonization with bone cells has been shown repeatedly [7].



FIG.3. Population densities of MG 63 cells on day 1, 3 and 7 after seeding on CFRC composites and reference samples (see Material and Methods). Mean ± S.E.M. from 9 digital pictures for each experimental group and time interval. ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Statistical significance: E, F, D1, D2, D3, PS, S, H: p≤0.05 in comparison with the sample of the same label.



FIG.4. Population densities of MG 63 cells on day 1, 3 and 7 after seeding on CFRC composites and reference samples (see Material and Methods). Mean ± S.E.M. from 2 samples for each experimental group and time interval. Each sample was measured 100 times in the Cell Viability Analyser. ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Statistical significance: E, F, D1, D2, D3, PS, S, H: p≤0.05 in comparison with the sample of the same label.



63 cells on day 1 after seeding on CFRC composites and reference samples (see Material and Methods). Mean ± S.E.M. from 90 to 162 cells for each experimental group (black columns) or from 9 microscopic fields for each experimental group, each containing 5 to 33 cells (white columns). ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Only on day 7 after seeding did the cell population density become significantly higher on ground CFRC coated with ZrN in the magnetron (sample D2, FIG.3), though this result was apparent only in the digital pictures, but not in the values obtained in the Cell Analyzer (FIG.4). A certain disproportion between the two methods of cell counting could be explained by the fact that the digital pictures were taken only from selected regions on the material surface, whereas for counting in the Cell Analyzer the cells were taken from the entire material surface, and only viable cells were taken into account.

Counting in the Cell Analyzer also revealed that, from day 3 after seeding, the numbers of viable cells on the CFRC samples was usually significantly lower than on standard cell culture substrates, mainly polystyrene dishes (FIG.4). A possible explanation is that standard cell culture polystyrene dishes and glass coverslips have considerably lower roughness than the CFRC samples and, they are usually more hydrophilic. It is generally known that cell adhesion is highest on moderately wettable surfaces [8]. Nevertheless, despite the relatively high hydrophobicity of the CFRC samples (water drop contact angle from 87±8° to 97±6°), the cells on these materials grew exponentially (FIG.6).

BI MATERIALS



FIG.6. Growth curves of MG 63 cells on CFRC composites and reference samples (see Material and Methods). Data obtained from counting cells on digital pictures taken from 9 randomly selected microscopic fields for each experimental group and time interval.

In addition, the cells were usually polygonal and well spread and able to form a confluent cell layer (FIGs.7 and 8). Sometimes, a biocompatible material colonized with a lower number of cells could be more appropriate, for example in the case of the implant removal or exchange.

By contrast, the cells on ceramic materials containing TCP and HAp were not able to spread and proliferate. They remained round and were attached to the substrate in very low cell population densities, which showed a decreasing tendency from day 1 to 7 (FIGs.3,4,6). As revealed by the trypan-blue exclusion test performed during cell counting in the Cell Viability Analyser, most of these cells were dead (FIG.4). These results were surprising, because earlier we had found that the adhesion and growth of MG 63 cells on similar materials were similar or even better than those obtained on tissue culture polystyrene dishes [6]. The low adhesion, growth and viability of MG 63 cells in the present study were most likely due to strong acidification of the culture media by the ceramic materials.

Conclusion

All tested CFRC samples, especially those ground with metallographic paper, proved to be good substrates for the adhesion and growth of human-osteoblast-like MG 63 cells, although the cell numbers on these materials were often lower than on standard cell culture polystyrene dishes and microscopic glass coverslips. Coating with ZrN had no adverse effects on the cell adhesion and growth. At the same time, we can expect the material surface to be strengthened by this coating. Thus, ZrN films can be considered as suitable materials for surface modification of body implants in order to improve their mechanical properties and their integration with the surrounding tissue.

Acknowledgement

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (grant No. 101/06/0226) and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (research project MSM 6840770012 - CTU No. 12105 3405 121). We also thank Mrs. Ivana Zajanova (Inst. Physiol., Acad. Sci. CR, Prague) and Mrs. Vlasta Vonkova (Czech Technical University, Prague) for their excellent technical assistance. Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for the language revision of the manuscript.



FIG.7. Morphology of MG 63 cells on day 3 after seeding on a ground CFRC sample coated with ZrN deposited by electrical arc (sample D3, see Material and Methods). Stained with Texas Red C2-maleimide and Hoechst 33342. Olympus IX 50, digital camera DP 70, obj. 20x, bar =200µm.



FIG.8. Morphology of MG 63 cells on day 7 after seeding on a non-ground CFRC sample, coated with ZrN deposited by magnetron sputtering (sample D1, see Material and Methods). Stained with Texas Red C2-maleimide and Hoechst 33342. Confocal microscope DM 2500 (Leica, Germany), obj. 10x

References

B. Grössner-Schreiber, M. Herzog, J. Hedderich, A. Dück,
 M. Hannig, M. Griepentrog: Clin Oral Implants Res 17:736-745,
 2006

[2] R. Lappalainen, SS. Santavirta: Clin Orthop Relat Res 430:72-79, 2005

[3] L. Bacakova, V. Stary, O. Kofronova, V. Lisa: J Biomed Mater Res. 54:567-78, 2001

[4] H. B. Bhuvaneswari, I. Nithiya Priya, R. Chandramani, V. Rajagopal Reddy, and G. Mohan Rao: Cryst Res Technol 38, 1047 – 1051, 2003

[5] D. F. Arias, Y. C. Arango, A. Devia: Applied Surface Science 253: 1683–1690, 2006

[6] L. Bacakova, I. Jungova, A. Ślósarczyk, A. Zima, Z. Paszkiewicz: Inżynieria Biomateriałów (Engineering of Biomaterials), 7: 15-18, 2004

[7] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran and B. D. Boyan: J Biomed Mater Res A 74: 49-58, 2005

[8] L. Bacakova, K. Walachova, V. Svorcik and V. Hnatowitz: J Biomater Sci Polym Ed 12: 817-834, 2001

......

BADANIA NAD SYNTEZĄ I WŁAŚCIWOŚCIAMI WIELOFUNKCYJNYCH MONOMERÓW URETANOWO-METAKRYLOWYCH DO KOMPOZYCJI DENTYSTYCZNYCH

Monika Biernat, Gabriel Rokicki, Mikołaj Szafran, Agnieszka Cwalińska

Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny, Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, Polska mbiernat@ch.pw.edu.pl,

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 9-11]

Wstęp

Typowa kompozycja dentystyczna składa się z dwóch monomerów dimetakrylowych: bis-GMA (2,2-bis[4-(2-hydroksy-3-metakryloksy-propylo)fenylo]propan) i TEGDMA (dimetakrylan glikolu trietylenowego). Dzięki obecności grup hydroksylowych w swej strukturze, bis-GMA posiada wiele zalet, jak: mała lotność i mała dyfuzja do tkanek, mały skurcz polimeryzacyjny i dobra adhezja do szkliwa. Niestety posiada również wady takie jak: duża lepkość, mała konwersja grup winylowych w czasie polimeryzacji i duża chłonność wody wytworzonego polimeru [1]. W celu zwiększenia konwersji grup winylowych stosuje się najczęściej dodatek monomerów o mniejszej lepkości (TEGDMA), jednakże powoduje on wzrost skurczu polimeryzacyjnego i inhibicji tlenowej [2].

Inhibicja tlenowa powoduje w czasie sieciowania niepożądane efekty, jak: mała szybkość polimeryzacji, długi okres indukcji, mała konwersja i powstawanie lepkiej niespolimeryzowanej warstwy na powierzchni utwardzanego produktu. Aby ograniczyć inhibicję tlenową opracowuje się nowe monomery zawierające cykliczne ugrupowania węglanowe lub uretanowe, charakteryzujące się mniejszą inhibicją tlenową [1]. Zjawisko skurczu polimeryzacyjnego powoduje powstawanie naprężeń w kompozycie, które odpowiadają za utratę szczelności pomiędzy kompozytem a strukturą zęba. Aby ograniczyć skurcz polimeryzacyjny opracowuje się nowe monomery o dużych wymiarach przestrzennych, w których stężenie reaktywnych wiązań nienasyconych jest małe [3].

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad syntezą i fotopolimeryzacją wielofunkcyjnych monomerów uretanowo-metakrylowych, które otrzymano metodą bezizocyjanianową. Monomery te wykazują mały skurcz polimeryzacyjny i małą inhibicję tlenową.

Część eksperymentalna

Materiały

Glicerol, węglan potasu (POCH). Eter diglicydylowy Bisfenolu A był otrzymany z żywicy epoksydowej Epidian 6 (Z.Ch. "Sarzyna" S.A., Polska) przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałe reagenty (Aldrich) użyte zostały bez dodatkowego oczyszczania.

Synteza wielofunkcyjnych monomerów uretanowometakrylowych

Węglan glicerolu otrzymano zgodnie z procedurą opisaną w zgłoszeniu patentowym P-363197 (2003) w reakcji

RESEARCH ON THE SYNTHESIS AND PROPERTIES OF MULTIFUNCTIONAL URETHANE-METHACRYLIC MONOMERS FOR DENTAL COMPOSITIONS

Monika Biernat, Gabriel Rokicki, Mikołaj Szafran, Agnieszka Cwalińska

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF CHEMISTRY, NOAKOWSKIEGO 3, 00-664 WARSAW, POLAND MBIERNAT@CH.PW.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 9-11]

Introduction

A typical dental composition consist of two dimethacrylic monomers: bis-GMA (2,2-bis[4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxy-propyl)phenyl]propane) and TEGDMA (triethylene glycol dimetha-crylate). Thanks to the presence of hydroxylic groups in the molecular structure, bis-GMA exhibits some advantages: low volatility and diffusivity into tissues, low cure shrinkage and good adhesion to enamel, and disadvantages: high viscosity, low vinyl groups conversion under ambient polymerization conditions and relatively high water uptake of the cured polymer [1]. The addition of a less viscous monomer (TEGDMA) causes an increasing vinyl groups conversion, but unfortunately it also causes an increasing polymerization shrinkage and oxygen inhibition [2].

Oxygen inhibition causes numerous deleterious effects on free-radically cured products including slow polymerization rates, long induction period, low conversion and tacky surface properties. To overcome oxygen inhibition new multifunctional monomers containing cyclic carbonate groups or urethane linkages, characterized with low oxygen inhibition are developed [1]. The problem of polymerization shrinkage creates contraction stresses in the composite restoration, which can disrupt the marginal seal between the composite and the tooth structure. To overcome the polymerization shrinkage new monomers with big spatial dimension and low concentration of methacrylic double bonds in molecule are developed [3].

In this paper we report on the synthesis and photopolymerization of multimethacrylic monomers with urethane linkages, which are obtained via a new non-isocyanate route. These monomers exhibit low polymerization shrinkage and low oxygen inhibition.

Experimental

Materials

Glycerol, potassium carbonate were obtained from POCH. Diglycidyl ether of Bisphenol A was isolated from epoxy resin Epidian 6 (Z.Ch. "Sarzyna" S.A., Poland) by distillation under reduced pressure. Other reagents (Aldrich) were used without additional purification.

Syntheses of multifunctional urethane-methacrylic monomers

Glycerol carbonate was prepared according to the known procedure described in patent P-363197 (2003) in reaction of glycerol and dimethyl carbonate in the presence of potassium carbonate in 75°C. 2,2-bis[4-(2,3-dihydroxy-

10



SCHEME I.

glicerolu i węglanu dimetylu, w obecności węglanu potasu w 75°C. Diwęglan 2,2-bis[4-(2,3-dihydroksypropoksy)fhenylo]propanu otrzymano z eteru diglicydylowego Bisphenolu A i dwutlenku węgla w obecności KI and 18-korona-6 jako katalizatora, zgodnie z procedurą opisaną w [d]. Multimetakrylowe monomery uretanowe zsyntezowano w reakcji wielohydroksylowych pochodnych uretanowych i chlorku metakryloilu lub bezwodnika metakrylowego. Wielohydroksylowe pochodne uretanowe otrzymano z węglanu glicerolu lub diwęglanu 2,2-bis[4-(2,3-dihydroksypropoksy)fenylo]propanu i diamin: heksametylenodiaminy, etylenodiaminy lub aminoalkoholi: etanoloaminy, 3-amino-1-propanolu, zgodnie z procedurą podaną w [4,5] (SCHEMAT 1).

Fotopolimeryzacja

Powierzchnie monomerów (ok. 60µm) zawierających 5% dodatek kamforochinonu jako fotoinicjatora naświetlano przy użyciu średniociśnieniowej lampy rtęciowej PLK Typ 5 (80 W) w atmosferze powietrza.

Badania

Przy użyciu spektroskopii FTIR (Spektrofotometr FT-IR FTS-165) określono konwersję wiązań podwójnych w czasie naświetlania w atmosferze powietrza. Przy użyciu spektroskopii Ramana (Spektrometr Ramanowski, Nicolet Almega, 780 nm, dioda laserowa) określono konwersję wiązań podwójnych na różnych głębokościach naświetlanych warstw. Przy użyciu wagi hydrostatycznej określono wielkość skurczu polimeryzacyjnego.

Wyniki i dyskusja

W celu otrzymania tetrametakrylowych monomerów uretanowych zastosowano dwa typy pięcioczłonowych węglanów cyklicznych: węglan glicerolu i diwęglan 2,2-bis[4-(2,3-dihydroksypropoksy)fenylo]propanu. Cykliczne węglany początkowo zostały przeprowadzone w uretanowe tetrole w reakcji z odpowiednimi diaminami alifatycznymi lub aminoalkoholami. Uretanowe tetrole zostały następnie poddane reakcji z chlorkiem metakryloilu lub bezwodnikiem metakrylowym dając uretanowe tetrametakrylany (SCHEMAT 1).

W wyniku reakcji otrzymanych pięcioczłonowych węglanów cyklicznych z aminami, powstają trzy izomery tetrahydroksylowych pochodnych uretanowych. propoxy)phenyl]propane dicarbonate was prepared from diglycidyl ether of Bisphenol A and carbon dioxide in the presence of KI and 18-crown-6 as catalists, according to the procedure described in [d]. Multimethacrylic monomers with urethane groups were synthesized in reaction of multihydroxylic urethane derivatives and methacryloil chloride or methacrylic anhydride. Multihydroxylic urethane derivatives were synthesized from glycerol carbonate or 2,2-bis[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]propane dicarbonate and diamines: hexamethylenediamine, ethylenediamine, or aminoalcohols: ethanoloamine, 3-amino-1-propanol, according to the procedure described in [4,5] (SCHEME1).

Photopolymerization

The layers (ca. 60μ m) of the monomers containing 5 % of camphorquinone as a photoinitiator were irradiated using a medium-pressure mercury lamp PLK Type 5 (80 W) in an air atmosphere.

Measurements

FTIR (FT-IR spectrometer FTS-165) was used to measure the conversion of methacrylic double bonds during light curing under an air atmosphere. Raman spectroscopy (Raman spectrometer, Nicolet Almega, 780 nm by diode laser) was used to measure the conversion of methacrylic double bonds in a various depth of layers. Hydrostatic balance was used to measure the polymerization shrinkage.

Results and discussion

For obtaining urethane tetramethacrylates we used two types of five-membered cyclic carbonates as starting materials: glycerol carbonate and 2,2-bis[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]propane dicarbonate. Cyclic carbonates were first converted to a urethane tetrols by a reaction with an appropriate aliphatic diamines or aminoalcohols. The urethane tetrol products were reacted with methacryloyl chloride or methacrylic anhydride to give the corresponding urethane tetramethacrylates (SCHEME 1).

In a result of the reaction of obtained five-membered cyclic carbonates with amine, three isomers of the tetrahydroxyurethane derivatives are formed. The resulting mixtures of urethane tetramethacrylic isomers are a viscous oils – useful form for dental applications.



RYS.1. Konwersja wiązań podwójnych w czasie tetrametakrylowych monomerów uretanowych 3a i 6a w porównaniu z typową kompozycją dentystyczną (Bis-GMA-TEGDMA 3/1) (7).with hematoxylin and eosin, Olympus IX 50 microscope, bar=200μm.

FIG.1. The conversion of double bonds vs. UV-irradiation time for urethane tetramethacrylate monomers 3a and 6a in comparison to a typical dental composition (Bis-GMA-TEGDMA 3/1) (7).

Końcowe produkty w postaci mieszanin izomerów uretanotetrametakrylanów są olejami, co czyni je atrakcyjnymi do zastosowań stomatologicznych.

Przeprowadzono fotopolimeryzację tetrametakrylowych monomerów uretanowych i typowej kompozycji dentystycznej i zbadano inhibicję tlenową. Kinetykę fotopolimeryzacji określono przy użyciu spektroskopii FTIR i konfokalnej mikroskopii Ramana. Konwersja wiązań podwójnych wielofunkcyjnych monomerów metakrylowych zawierających ugrupowania uretanowe jest większa niż kompozycji zawierających bis-GMA, dla tego samego czasu naświetlania (RYS.1). Obecność czterech grup metakrylowych w cząsteczce prowadzi do szybkiego wzrostu lepkości, co ogranicza dyfuzję tlenu i zmniejsza inhibicję na powierzchni naświetlanej warstwy (RYS.2). Dodatkowo, tworzenie się wiązań wodorowych pomiędzy ugrupowaniami uretanowymi prowadzi do dużej szybkości sieciowania. Otrzymane monomery multimetakrylowe z ugrupowaniami uretanowymi wykazują mniejszy skurcz polimeryzacyjny niż typowa kompozycja dentystyczna (RYS.3.)

Wnioski

Piśmiennictwo

Multimetakrylany z ugrupowaniami uretanowymi zostały zsyntezowane bezpieczną bezizocyjanianową metodą. Badania fotopolimeryzacji otrzymanych monomerów potwierdzają ich dużą konwersję, mniejszą inhibicję tlenową i mniejszy skurcz polimeryzacyjny niż w przypadku kompozycji zawierających bis-GMA.

[1] J.F.G. Jansen; A.A. Dias; M. Dorschu; B. Coussens Macromo-

Icules 2003, 36, 3861. [2] Khatri, C. A.; Stansbury, J. W.; Schultheisz, C. R.; Antonucci, J.

M; Dental Materials 2003, 19, 584.

[3] J. Ge; M. Trujillo; J. Stansbury, Dental Materials 2005, 21, 1163-1169.

RYS.2. Fragment widma Ramana monomeru 6a na różnych głębokościach warstwy (wiązania C=C) po 30 s naświetlania.

FIG.2. A fragment of the Raman spectra of the monomer 6a assigned to C=C groups after 30 s of UV-irradiation recorded at different layer depths: 0 to 20µm. RYS.3. Skurcz polimeryzacyjny wielofunkcyjnych monomerów uretanowo-metakrylowych. FIG.3. The polymerization shrinkage of multifunctional urethanemethacrylic monomers.

Photopolymerization of the tetramethacrylic monomers and typical dental composition was investigated with respect to oxygen inhibition. Kinetic investigations of photopolymerization were carried out by measuring of double bonds conversion using FTIR spectroscopy as well as confocal Raman microscopy. It was found that the conversion of multifunctional methacrylic monomers containing urethane linkages is much greater than that of composition with bis-GMA for the same irradiation time (FIG.1). The presence of four methacrylic groups in a monomer molecule leads to a fast increase in viscosity which decreases the oxygen solubility and suppresses inhibition in the upper layer of the resin (FIG.2). In addition, the formation of hydrogen bonds between urethane groups leads to faster crosslinking of the resin. The obtained multimethacrylic monomers with urethane linkages exhibit smaller polymerization shrinkage than typical dental composition (FIG.3.)

Conclusion

Urethane multimethacrylates were synthesized via synthetic pathway that is safer and more environmentally friendly than those involving isocyanates. Photopolymerizations of the obtained monomers indicated higher conversions, lower oxygen inhibition and smaller polymerization shrinkage than those obtained for bis-GMA.

References

[4] M. Biernat; G. Rokicki " Five-membered Cyclic Carbonates in the Synthesis of Multifunctional Urethane-methacrylates with Low Oxygen Inhibition"- w "Na Pograniczu Chemii i Biologii" Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2006.

[5] M. Biernat; G. Rokicki, e-Polymers 2005, http://www.e-polymers. org. ISSN 1618-7229.

OCENA PORÓWNAWCZA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH ODBIAŁCZONEJ KOŚCI LUDZKIEJ I JEJ MIESZANINY Z BIOSZKŁEM – BADANIA WSTĘPNE NA ZWIERZĘTACH

Jacek Nocoń¹, Magdalena Cieślik², Jan Rauch³, Maria Łączka⁴, Beniamin Rauch⁵, Tadeusz Cieślik⁵

¹ PRYWATNA PRAKTYKA DENTYSTYCZNA,
46145 OBERHAUSEN, FINANZSTRASSE 8, NIEMCY
² ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA I PROPEDEUTYKI STOMATOLOGII, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, BYTOM
³ NZOZ – SPEC. PRZYCH. STOM.,
UL. E. I K. WOJTYŁÓW 16, 34-100 WADOWICE
⁴ KATEDRA TECHNOLOGII SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH,
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW
⁵ I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, ZABRZE

Streszczenie

Celem prowadzonych badań doświadczalnych jest ocena gojenia ran kostnych w obecności preparatu odbiałczonej kości ludzkiej (grupa I) oraz jej mieszaniny z bioszkłem (grupa II) w warunkach dotkankowej implantacji. Badania przeprowadzono na grupie 24 świnek morskich z okresami kontroli przypadającymi na 1, 2, 3, 4, 8 i 12 tydzień doświadczenia. Zwierzętom wszczepiano badany materiał w ubytek kostny trzonu żuchwy. Przeprowadzono obserwacje kliniczne przebiegu gojenia ran, podstawowe badania krwi, pomiary gęstości kości, a także badania radiologiczne i makroskopowe. Zaplanowano również wykonanie oceny histopatologicznej tkanki kostnej oraz narządów wewnętrznych (wątroba, nerki) oraz badań histoenzymatycznych. W obu przypadkach nie obserwowano powikłań w gojeniu ran pooperacyjnych. Makroskopowo zarówno w I jak i w II grupie ubytki kostne uległy wygojeniu po 4 tygodniu badań. Wskaźniki oznaczone w trakcie badań krwi zwierząt doświadczalnych utrzymywały się w granicach norm już od 14 doby eksperymentu. Radiologicznie proces gojenia tkanki kostnej uległ całkowitemu zakończeniu dla grupy I po 8, a dla grupy II po 12 tygodniu doświadczenia. Wstępne wyniki badań wykazały, iż rany kostne wypełnione odbiałczoną kością ludzką goiły się szybciej niż te wypełnione mieszaniną odbiałczonej kości ludzkiej z bioszkłem. Oba materiały można ocenić jako bardzo obiecujące dla zastosowań kościozastępczych.

Słowa kluczowe: naturalny hydroksyapatyt, odbiałczona kość ludzka, bioszkło, regeneracja ubytków kostnych, badania in vivo na zwierzętach

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 12-16]

COMPARATIVE EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF DEPROTEINIZED HUMAN BONE AND ITS MIXTURE WITH BIO-GLASS - PRELIMINARY EXAMINATION PERFORMED ON ANIMALS

Jacek Nocoń¹, Magdalena Cieślik², Jan Rauch³, Maria Łączka⁴, Beniamin Rauch⁵, Tadeusz Cieślik⁵

 ¹ PRIVATE DENTISTRY PRACTICE, 46145
 OBERHAUSEN, FINANZSTRASSE 8, GERMANY
 ² SECTION OF MATERIALS TECHNOLOGY AND DENTISTRY
 PROPEDEUTICS, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, BYTOM
 ³ NZOZ – SPECIALISTIC DENTISTRY CLINIC,
 UL. E. I K. WOJTYŁÓW 16, 34-100 WADOWICE
 ⁴ DEPARTMENT OF GLASS TECHNOLOGY AND AMORPHOUS COAT-INGS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW
 ⁵ I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, ZABRZE

Abstract

The aim of this experimental examination is the evaluation of the healing process of osseous wounds with the presence of a preparation containing deproteinized human bone and (group I) and the mixture of deproteinized human bone with bio-glass (group II), implanted in tissue. The examination was carried out on a group of 24 guinea pigs and the control was performed in the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 8th and 12th weeks of the examination. The material under analysis was implanted in the osseous wounds of the animals' mandible corpus. The following examinations were then performed: clinical observation of the healing process, basic blood examinations, bone tissue density measurements, radiological and macroscopic examinations. Additionally, the examiners planned to carry out histopathological examination of the osseous tissue and the internal organs (kidney, liver), as well as histoenzymatic examination. In both cases no complications during the healing process were observed. The macroscopic examination showed that in both groups (I and II) the osseous wounds were healed after the 4th week of the examination. The indices determined during the blood examination of the animals used in the experiment remained within the standard limits from the 14th day of the experiment. The radiological examination showed that the osseous wound healing process was totally ended after the 8th week of the examination in the case of group I, and after the 12th week in the case of group II. Preliminary results of the examination showed that the osseous wounds filled with deproteinized human bone healed faster than these filled with the mixture of deproteinized human bone and bio-glass. Both materials can be evaluated as highly promising in bone-replacing use.

Keywords: natural hydroxyapatite, deproteinized human bone, bio-glass, osseous wounds regeneration, in vivo experiments on animals

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 12-16]

Wprowadzenie

Obecnie jako biomateriały stosuje się niezliczoną ilość tworzyw metalicznych, polimerowych, węglowych czy ceramicznych. Tworzone z ich udziałem kompozyty odznaczają się coraz to doskonalszymi właściwościami z punku widzenia biomechaniki czy medycyny praktycznej [1]. Niewątpliwie jednak najlepszym materiałem rekonstrukcyjnym jest własna tkanka, dlatego też w praktyce chirurgicznej dominują przeszczepy autogenne [2-4]. Pobranie autoprzeszczepu wiąże się jednak z wykonaniem dodatkowego zabiegu celem uzyskania odpowiedniego fragmentu tkanki, co powoduje wydłużenie czasu operacji i jest dodatkowym obciążeniem dla pacjenta. W celu uniknięcia tychże niedogodności, zwłaszcza w chirurgii kostnej, stosuje się na szeroka skalę naturalne, bioaktywne preparaty na bazie odbiałczonych kości zwierzęcych [5,6]. Przykładem mogą być preparaty uzyskane z kości końskiej czy bydlęcej, w których całkowite usunięcie składników organicznych powoduje zniesienie ich właściwości immunogennych, co sprawia, że materiały takie są obojętne dla biorców [6-10]. Stosuje się je głównie do regeneracji ubytków kostnych w takich specjalnościach medycznych jak ortopedia, chirurgia stomatologiczna i szczękowo-twarzowa, a także periodontologia czy implantologia [11,12]. Ich obecność w organizmie ludzkim może jednak prowadzić do przeniesienia bakterii, wirusów czy niektórych chorób odzwierzęcych. Zastosowanie zamiennie odbiałczonej kości ludzkiej mogłoby zlikwidować tego rodzaju zagrożenia. Wykorzystanie jej dodatkowo do stworzenia mieszaniny z materiałem zaliczanym do ceramiki bioaktywnej, a mianowicie bioszkłem, mogłoby stanowić ciekawe rozwiązanie materiałowe do celów kościozastępczych [13]. Na istotny fakt zasługuje dodatkowo to, iż Polska jest nielicznym z krajów na świecie, gdzie pobieranie tkanek ludzkich jest uregulowane prawnie ustawą z dnia 26 października 1995 roku (Dz. U. Nr 138/1995 r. poz. 682) wraz z nowelizacją z dnia 20 czerwca 1997 roku (Dz.U. nr 104/1997 r. poz. 661).

Materiał i metody

W pracy zastosowano czystą odbiałczoną kość ludzką (grupa I) oraz jej mieszaninę z bioszkłem (grupa II). Użyty preparat kości ludzkiej był w formie granulatu o średnicy od 0,3 do 0,5 mm i został zakupiony w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa - Bank Tkanek w Katowicach. Bioszkło, także w formie granulatu o takiej samej średnicy, zostało wytworzone metodą zol-żel z układu CaO-SiO₂-P₂O₅ w laboratorium Katedry Szkła i Powłok Amorficznych AGH w Krakowie. Zastosowano jego odmianę wysokowapniową A2 (54%mol. CaO) o gęstości 2,9082 /cm³ z dominującą fazą szklistą i początkami krystalizacji apatytu. Do wytworzenia bioszkła zastosowano obróbkę termiczną w temperaturze 800°C.

Badaniem objęto populację 24 świnek morskich, w równej liczbie obojga płci o wadze od 500 do 600g. Zostały one znieczulone Tiopentalem w dawce 0,4g/kg masy ciała. Wszystkie zabiegi przeprowadzono w Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej ŚAM w Katowicach za zgodą Komisji Bioetycznej ds. Badań na Zwierzętach.

Po lewej stronie głowy zwierząt w trzonie żuchwy wykonano ubytki kostne o średnicy 6 mm i głębokości 3mm. W grupie I, którą stanowiło 12 świnek morskich, wypełniono je odbiałczoną kością ludzką, a w grupie II, u takiej samej liczby zwierząt, jej mieszaniną z bioszkłem.

U wszystkich zwierząt wykonano obserwacje kliniczne przebiegu gojenia ran, a także podstawowe badania krwi. Po ich uśmierceniu przeprowadzono badania makrosko-

Introduction

Nowadays, a great number of metal, polymer, carbon and ceramic materials are used as biomaterials. The composites containing them attain better and better properties from the point of view of biomechanics or practical medicine [1]. Undoubtedly, however, one's own tissue is the best reconstructive material. That is why autogenous transplants play the leading role in surgical practice [2-4]. However, autotransplantation involves performing an additional operation necessary to collect the osseous tissue fragment. It prolongs the operation time and is an additional inconvenience for the patient. In order to avoid such inconvenience, especially in osseous surgery, natural bioactive preparations based on deproteinized animal bone are widely used [5,6]. An example of such preparations can be those made of horse or bovine bone, in which total removal of organic components excludes their immunogenous properties, which makes such materials totally indifferent for the recipients [6-10]. They are mainly used for the regeneration of osseous decrements in such medical fields as orthopaedics, oral and maxillofacial surgery, and also periodontics or impaintology [11,12]. However, their presence in the human organism can result in the transmission of bacteria, viruses or certain epizootic diseases. The use of deproteinized human bone could eliminate hazards of this kind. In addition, using it for a mixture with bioactive materials, mainly bioglass, could be a useful bone-replacing material [13]. It should also be emphasised that Poland is one of the few countries where taking human tissue is legal, as regulated by the Regulation of 26 October 1995 (Journal of Law No 138/1995 paragraph 682) and its amendment of 20 June 1997 (Journal of Law No 104/1997 paragraph 661).

Material and methods

In the examination, deproteinized human bone (group I) and its mixture with bio-glass (group II) were used. The preparation used was in the form of granulate with the diameter from 0,3 to 0,5mm. It was bought in the Regional Blood Donation and Blood Treatment Center – Tissue Bank in Katowice (Poland). The bio-glass, also in the form of a granulate of the same diameter, was made with the use of the zol-gel technology from the CaO-SiO₂-P₂O₅ in the laboratory of the Glass and Amorphous Coatings Department of the AGH Science and Technology University in Krakow (Poland). Its high-calcium variety A2 was used (54% mol. CaO) of 2,9082g/cm³ density with dominating glassy phase and the beginnings of apatite crystallization. The thermal treatment of the bio-glass was performed at the temperature of 800°C.

The examination was carried out on a group of 24 guinea pigs, equal number of both genders, weighing from 500 to 600 grams. The animals were anaesthetized with Tiopental in the dose of 0.4g/kg of the body weight. All the operations were performed at the Central Experimental Animal Farm of the Silesian University in Katowice and with the permission of the Bio-Ethical Board for Experimental Animals.

On the left side of each animal's head, in the corpus of the mandible, a defect was made (6mm in diameter and 3mm in depth). In group I, consisting of 12 guinea pigs, it was filled with deproteinized human bone and in group II, also 12 guinea pigs, it was filled with mixture of deproteinized human bone with bio-glass.

All the animals underwent clinical observations of the wound healing, as well as basic blood analyses. After the sacrificing of the animals, macroscopic and radiological examinations were performed (in the X-ray laboratory of the

powe i radiologiczne (pracownia rentgenowska I Katedry i Kliniki Chirurgii Szczękowo-Twarzowej w Zabrzu) w 7, 14 i 21 dobie oraz w 4, 8 i 12 tygodniu doświadczenia. Dodatkowo, na podstawie tomografii komputerowej, we wszystkich okresach badawczych, oznaczano gęstość kości w miejscu wprowadzonego wszczepu oraz w jego otoczeniu (Szpital Rejonowy w Suchej Beskidzkiej - pracownia diagnostyki obrazowej). W dalszym etapie eksperymentu zaplanowano badania histopatologicznie tkanki kostnej oraz narządów wewnętrznych (wątroba, nerki) oraz badania histoenzymatyczne.

Wyniki badań

W obu grupach podczas obserwacji klinicznych przebiegu gojenia ran nie stwierdzono u badanych zwierząt bólu pooperacyjnego, co przejawiało się ich spokojnym zachowaniem. Początkowo były znacznie osłabione, wraz z upływem czasu stawały się bardziej ruchliwe. Picie wody i przyjmowanie karmy rozpoczęły w okresie od 2–6 godzin od zabiegu. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta nie ocierały się o klatki i nie rozdrapywały ran. W żadnej z grup nie obserwowano również ich rozchodzenia się. Szwy usunięto w 10-14 dobie eksperymentu.

Makroskopowo proces gojenia ran kostnych u świnek morskich w obu grupach przebiegał w sposób prawidłowy. Nie stwierdzono odczynów zapalnych czy też objawów chełbotania (brak krwiaka lub też obfitej wydzieliny przyrannej). Zarówno w grupie I jak i II ubytki kostne uległy wygojeniu po 4 tygodniu badań.

Wszystkie wskaźniki oznaczone w trakcie badań krwi zwierząt w obu grupach utrzymywały się w granicach norm już od 14 doby eksperymentu. Wyjątkiem była liczby granulocytów we krwi, które osiągnęły odpowiednie wartości po 8 tygodniu badań.

Badania radiologiczne już po 7 dobie eksperymentu wykazały różnice w szybkości tworzenia się nowej tkanki kostnej w miejscach ubytków w zależności od zastosowanych materiałów. Po 7 dobach w grupie I stwierdzono obecność kulistego przejaśnienia o regularnych brzegach odpowiadającego wielkością wykonanemu ubytkowi kostnemu. Rozpoczynający się proces odbudowy kości, przejawiający się przymgleniem miejsca ubytku, widoczny był dopiero po 14 dobie badań. Otrzymane w trakcie badań radiologicznych obrazy wykazały natomiast, iż w grupie II rozpoczęcie procesu kościotworzenia nastąpiło już po 7 dobie eksperymentu. W miejscu wykonanego ubytku widoczne było wprawdzie nieregularne przejaśnienie ale w jego centralnym obszarze dało się zauważyć niewielkie zacienienie, którego obszar i wyrazistość powiększały się wraz z upływem czasu. Prawie zakończony proces tworzenia się nowej tkanki kostnej w grupie I uwidoczniły obrazy rentgenowskie po 4 tygodniu doświadczenia. W tym okresie jedynie na obrzeżach ubytku widać było niewyraźne przejaśnienie świadczące o toczącym się procesie osteogenezy. Całkowite wytworzenie się w tej grupie nowej tkanki w miejscu rany kostnej nastąpiło po 8 tygodniu eksperymentu. Cały ubytek był nader wyraziście zacieniony, co świadczyło o powstaniu bardziej mineralizowanej tkanki niż otoczenie (RYS.1). W grupie II natomiast jeszcze po 8 tygodniu można było dostrzec niewielkie przejaśnienie w górno-przyśrodkowym biegunie rany kostnej (RYS.2), a całkowicie zakończony proces kościotworzenia zaobserwowano dopiero po 12 tygodniach eksperymentu. Ujawniła się wzmożona mineralizacja tkanki kostnej przejawiająca się na obrazach radiologicznych wyraźnym zacienieniem w miejscu wykonanego ubytku.

1st Department and Clinic of Oral and Maxillofacial Surgery, Zabrze), which was done on the 7th, 14th and 21st day, and in the 4th, 8th and 12th week of the experiment. Additionally, in every period of the study, bone density was determined in the bone graft site and its surroundings, with the use of computer tomography. In the next stage of the experiment, histopathological examinations of the osseous issue and internal organs (kidney and liver) have been planned.

Results

In both groups, no post-operative pain was observed during the clinical observations of the wound healing process, which was proved by the animals' calm behaviour. First, the animals were considerably weak, but after a short period they became more active. They started to drink water and eat fodder after 2–6 hours after the operation. Throughout the whole experiment the animals did not scrap the cages or scratch the wounds. In neither groups did the wounds slacken. The stitches were removed on the 10^{th} – 14^{th} day of the experiment.

The macroscopic examination showed that the osseous wounds healing process was proceeding in a normal way in both groups. No inflammatory reactions fluctuation symptoms (lack of hematoma or plentiful secretion at the wound) were observed. Both in group I and in group II osseous wounds were healed after the 4th week of the examination.

All the indices determined during the laboratory analysis of the animals' blood remained within the standards limits starting from the 14th day of the experiment. An exception was the number of granulocytes in the blood, which reached its proper value after the 8th week of the experiment.

As early as on the 7th day of the examination radiological examination showed differences in the rate of new osseous tissue formation in the decrements, depending on the material used. After the 7th day of the experiment, in group I, a spherical clearing-up with regular borders was observed, which corresponded to the bone decrement made. The beginning of osseous tissue regeneration was only observed after the 14th day of the examination and it was manifested by a mistiness in the place of the bone decrement. The pictures obtained during the radiological examinations showed that in group II the beginning of the osseous tissue formation process started after the 7th day of the experiment. There was an irregular clearing visible in the place in the place of the decrement made, but in its central area there was a small shade, whose size and sharpness became more and more visible with time. The almost-finished process of the new osseous tissue formation in group I was made visible by X-ray pictures taken after the 4th week of the experiment. In this period there was only a slight clearing visible on the borders of the bone decrement, which showed the osteogenesis process proceeding. For this group, total regeneration of the new osseous tissue in the place of the bone decrement was observed after the 8th week of the experiment. The whole osseous wound was still clearly shady, which proved that more mineralized tissue was formed than its surrounding (FIG.1). In group II, still after the 8th week of the experiment, a slight clearing-up on the top-center pole of the wound was visible (FIG.2) and the process of osseous tissue regeneration was ended only after 12 weeks of the experiment. Intensified mineralization of the osseous tissue was visible in the X-ray pictures as a sharp shade in the places of the bone decrements.



RYS.1. 8 tydzień – grupa I – w miejscu wykonanego ubytku widoczna bardziej zmineralizowana kość niż otoczenie.

FIG.1. 8 week – group I – in the place of osseous wound it's noticeable significant signs of more mineralization of bone than its surrounded.

Z badań gęstości kości wynika, iż jedynie w grupie II po 12 tygodniu doświadczenia stopień mineralizacji ubytków kostnych był bardzo zbliżony do otaczających go tkanek. Przez dwa pierwsze okresy obserwacyjne gęstość kości w grupie I była wyraźnie większa niż w grupie II. Różnica ta wraz z upływem czasu powoli się zacierała. Po 8 tygodniu badań nastąpiła sytuacja odwrotna i ubytki z wszczepioną mieszaniną wykazywały obecność bardziej zbitej kości w porównaniu do ubytków z grupy I (RYS.3).



FIRYS.2. 8 tydzień – grupa II - w miejscu ubytku widoczna zmineralizowana tkanka kostna – górno-przyśrodkowym biegunie nieznaczne przejaśnienie.

FIG.2. 8 week – group II – it's noticeable mineralized osseous tissue – a slight clearing up lightness on the top-center pole of wound.

Bone density examinations show that only in group II after the 12th week of the experiment the degree of the bone decrements mineralization was similar to that of the surrounding tissue. During the first two observation periods the bone density in group I was higher than this in group II. The difference became less and less visible with time. After the 8th week of the experiment, a reverse situation happened and the decrements filled with the mixture of the deproteinized human bone and bioglass were characterized by a higher bone density, in comparison with the decrements from group I (FIG.3).

Wnioski

Z przeprowadzonych wstępnych badań doświadczalnych wynika, iż zarówno czysty jak i z dodatkiem bioszkła preparat odbiałczonej kości ludzkiej nie wywołuje żadnych negatywnych (szkodliwych) reakcji u badanych zwierząt. Badania radiologiczne pozwalają na stwierdzenie, iż rozpoczęcie procesu gojenia tkanki kostnej w grupie II nastąpiło szybciej niż w grupie I, gdyż już po 7 dobie ekspery-



RYS.3. Porównanie gęstości kości w miejscu ubytków. FIG.3. The comparison of bone density in place of osseous wounds.

mentu. Było to prawdopodobnie spowodowane obecnościa w tym materiale aktywnego biologicznie bioszkła, które od początku stymulowało proces osteogenezy. Zakończenie kościotworzenia w miejscu wykonanych ubytków kostnych nastąpiło szybciej w obecności czystego preparatu odbiałczonej kości ludzkiej. Niewątpliwie jednak miało to wpływ na jakość nowo powstałej tkanki kostnej. Potwierdzeniem tego są badania gęstości kości. Wykazały one bowiem, iż wytworzona w miejscu rany kostnej w grupie II nowa kość odznaczała się większą gęstością niż w przypadku czystego preparatu odbiałczonej kości ludzkiej, a co się z tym wiąże była bardziej zbliżona swą wartością do kości zbitej z otoczenia. Podsumowując można stwierdzić, iż zastosowanie czystego preparatu odbiałczonej kości ludzkiej spowoduje szybszą regenerację ran kostnych lecz w przypadku jej mieszaniny z bioszkłem można liczyć na lepszą jakość utworzonej w trakcie gojenia tkanki kostnej.

the presence of the bioactive bio-glass in the material used, which stimulated the osteogenesis process from the beginning. The ending of the osseous wound healing was guicker in the case of the decrements filled with pure deproteinized human bone. Undoubtedly, however, it influenced the quality of the newly-formed osseous tissue, which was shown by the bone density measurements. These measurements showed that new bone formed in the place of the bone decrement in group II was characterized by higher density than that, where the pure deproteinized human bone was used. What follows, its value was more similar to that of the surrounding compact bone. To sum up, it can be said that using pure preparation of the deproteinized human bone causes faster regeneration of the osseous wounds, but in the case of its mixture with bio-glass, a better quality of the osseous tissue can be obtained during the healing process.

Conclusion

The preliminary examinations show that both pure preparation of deproteinized human bone and its mixture with bio-glass do not cause any negative (harmful) effects with the animals under examination. Radiological examination proved that the beginning of the osseous wound healing in group II started sooner than in group I, as early as on the 7th day of the experiment. It was probably caused by

Piśmiennictwo

References

[1] Będziński R.: Biomechaniczne aspekty stosowania implantów. Inż. Biomat., 2003, 30-33, 130140.

[2] Gerber-Leszczyszyn B., Pawlak W., Dominiak M.: Możliwości rekonstrukcyjne pourazowych ubytków wyrostka zębodołowego szczęk z wykorzystaniem autogennego przeszczepu kostnego lub osteogenezy dystrakcyjnej - doniesienie wstępne. Dent. Med. Probl. 2005, 42, 1, 159 – 164.

[3] Lewandowski L., Grodzki J.: Możliwości odtwarzania pourazowych i ponowotworowych ubytków kostnych dna oczodołu materiałami autogennymi lub alogenicznymi. Otoral. Pol. 1996, 50(2), 135-138.
[4] Niedźwiedzki T., Kuryszko J.J.: Biologia kości. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.

[5] Cieślik-Bielecka A., Sabat D., Szczurek Z., Król W., Bielecki T., Cieślik T.: Wpływ odbiałczonej kości bydlęcej na gojenie ran kostnych. Inż. Biomat., 2001, 17-19, 36-37.

[6] Schwarz Z.: Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. J Peridontal., 2000, 71(8), 58-69.

[7] Cieślik-Bielecka A., Sabat D., Cieślik T. i wsp.: Odbiałczona kość bydlęca w rekonstrukcji ubytków kostnych – badania in vivo: Inż. Biomat., 2002, 23-25, 54-56. [8] Cieślik-Bielecka A., Sabat D., Szczurek Z., Król W., Bielecki T., Cieślik T.: Wpływ odbiałczonej kości bydlęcej na gojenie ran kostnych. Inż. Biomat., 2001, 17-19, 36-37.

[9] Haberko K., Bućko M., Haberko M. i wsp.: Hydroksyapatyt naturalny – preparatyka, właściwości. Inż. Biomat., 2003, 30-33, 32-37.

[10] Valentini P. i wsp: Histological evaluation of Bio-Oss in a 2-stage sinus floor evaluation and implantation procedure. A human case report. Clin, Oral Implants, 1998, 9(1), 59-64.

[11] Markowska M., Radwan-Oczko M., Ziętek M.: Clinical and radiographic evaluation of Bio-Oss for the treatment of periodontal intrabony defects-6 months study. Polim Med., 2005, 35(3), 67-74.

[12] Ogunsalu C.: Dental implant therapy in the treatment of an oroantral communication after exodontias. Implant Dent, 2005, 14(3), 232-6.

[13] Niedzielski K., Synder M., S. Mazurkiewicz i wsp.: Badania biomechaniczne nowej generacji ceramiki Sz2 jako materiałów kościo-zastępczych stosowanych w wypełnieniu ubytków kostnych wytworzonych doświadczalnie. Inż. Biomat., 2003, 28, 8-12.

• • • • • • • • • • • • • • • • •

WPŁYW PRZECIĘCIA TKANEK NA WYNIKI BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH KRĄŻKÓW STAWU SKRONIOWO -ŻUCHWOWEGO

W. CHLADEK, I. CZERWIKA

KATEDRA MODELOWANIA PROCESÓW I INŻYNIERII MEDYCZNEJ, POLITECHNIKA ŚLĄSKA UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 16-18]

Wprowadzenie

W skład przyczyn powodujących choroby stawów skroniowo-żuchwowych wchodzą zjawiska związane z rozkładami sił i naprężeń w komponentach stawu niemieszczące się w obszarach diagnostyki klinicznej [1]. Pełne wyjaśnienie tych zagadnień wymaga wykorzystania narzędzi biomechaniki takich jak analizy modelowe, oparte o metody numeryczne. Zgodność rezultatów obliczeń ze stanem naturalnego obiektu jest zależna od poprawnego zdefiniowania cech materiałowych badanego układu [2,3]. Wynika stąd duże znaczenie fazy zbierania danych materiałowych, bez której trudno sobie wyobrazić poprawną symulację numeryczną stanów mechanicznych zachodzących w organizmie żywym. W przypadku stawu skroniowo-żuchwowego kluczem jest określenie właściwości tkanek krążka stawowego [4-7]. Przedstawiona praca miała na celu określenie wpływu preparatyki próbek na zmiany charakterystyk mechanicznych tkanek krażków stawowych.

THE INFLUENCE OF TISSUE INCISION ON THE EXAMINATION RESULTS REGARDING TEMPOROMANDIBULAR JOINT DISCS' MECHANICAL PROPERTIES

W. CHLADEK, I. CZERWIKA

Department of Process Modelling and Medical Engineering, Silesian University of Technology 40–019 Katowice, ul. Krasińskiego 8

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 16-18]

Introduction

The causes include phenomena connected with forces and stress distribution in joint's components, which cannot be clinically diagnosed [1]. Therefore, a full explanation of these issues requires the application of biomechanical tools. The proper diagnostics method for obtaining the desired answers are model analyses based on numerical methods, such as the finite element method. Compliance of calculation results with the state of a natural object depends on approved boundary conditions, particularly on the defining correctly the investigated system's material properties [2,3]. Therefore, gathering data regarding the material has paramount importance, since it is hard to imagine a correct numerical simulation of the mechanical states present in a living organism [4-7]. This paper attempts to show how excising joint disc samples can influence the samples' mechanical characteristics.

Metodyka badań

Ze względu na trudności z pozyskiwaniem tkanek ludzkich do badań postanowiono wykorzystać krążki wieprzowe. Wygląd krążków wieprzowego i ludzkiego w świetle przechodzącym pokazano na RYS.1. Aby ocenić dokładnie stopień podobieństwa obydwóch obiektów, zmierzono grubości krążków oraz wielkość zagłębienia się w tkanki kulistego penetratora o średnicy 5mm, wgniatanego siłą 1,2N w czasie 15s. Za podstawę oceny przyjęto procentową wielkość zagłębienia penetratora odniesioną do grubości krążka w miejscu badanym. Badania wstępne przeprowadzono dla czterech krążków wieprzowych i dwóch ludzkich. Do analiz wytypowano zaznaczone na rycinie miejsca, z tyłu krążka (P), z przodu krążka (A) oraz strefę centralną (C).



RYS.1. Porównanie wyglądu krążków: a) wieprzowego, b) ludzkiego w świetle przechodzącym wraz z zaznaczonymi miejscami pomiarowymi A-z przodu, P-z tyłu, C-w centralnym punkcie krążka. FIG.1. Comparison of the view of a) porcine, b) human disc in transmission light with marked measurement places: A-anterior, P-posterior and C-central spot.

Zasadnicze badania własności mechanicznych przeprowadzono na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick o zakresie obciążenia 25 kN. Do badań przygotowywano: próbki walcowe o średnicy 5mm, krążki nieuszkodzone oraz krążki z ponacinane wokół strefy pomiaru. Po odpowiednim ułożeniu próbki względem stempla, zadawano po dziesięć cykli ściskania i odciążania przyjmując piłowy kształt charakterystyki siła-czas przy stałej prędkość przyrostu obciążenia równej 1N/s. Realizowano cykl odzerowy do maksymalnej wartości siły równej 3 N.

Wyniki badań

Rezultaty wstępnych badań porównawczych krążków ludzkich i wieprzowych zestawiono w TABELI 1 zawierającej średnie grubości oraz zagłębienie względne, wyznaczone jako stosunek wielkości zagłębienia penetratora do grubości krążka w badanym miejscu.

Pomiary grubości wykazały, że zarówno dla krążka ludzkiego, jak i wieprzowego można wyróżnić wyraźnie wzmocnione części przednie i tylne, przy czym część tylna jest grubsza i sztywniejsza od części przedniej. Środki i boki krążków są znacznie cieńsze i bardziej podatne na obciążenia.

Podczas cyklicznych badań krążków pętle histerezy stabilizowały się po 5 cyklu obciążenia. Przykładowe wykresy pokazano na RYSUNKU 2.

Na podstawie uzyskanych ustabilizowanych charakterystyk określono sztywności oraz moduły elastyczności próbek [4]. Dodatkowo odczytywano zakres całkowitego odkształcenia cyklu $\Delta \epsilon_c$ i odkształcenie $\Delta \epsilon_d$ charakteryzującego dyssypację energii. Wyniki, będące wartością średnią z trzech pomiarów na tkankach pochodzących od różnych zwierząt, zestawiono w TABELI 2.

Methods

The porcine samples were used for laboratory tests due to the similarity between chewing mechanisms in human beings and pigs. A highlighted view of human and porcine discs shown in FIG.1 illustrates similar diversification of tissue thickness in both discs. Disc thickness and penetration depth of a ball penetrator of 5mm in diameter, indented using force of 1.2N during 15s. The percentage ratio of penetrator's indentation to disc's thickness in the investigated spot was used as the basis for evaluation. Considering the possibility of taking samples later in the experiment, places marked in the figure were selected for analyses in the posterior (P), anterior (A) and central (C) parts. Preliminary investigation was carried out for four porcine and two human discs taken from a 67-year old donor.

Using the Zwick universal strength-testing machine with a 25kN load range. Prepared were: cylindrical samples of 5mm in diameter; complete undamaged discs; and discs with locally interrupted tissue continuity around the measurement zone.

After appropriate placement of the sample in relation to the penetrator, ten compression and relaxation cycles were applied with adopting a saw tooth control signal of the forcetime characteristics at a constantly increased loading rate of 1N/s. Cycles with zero to 3N force were realized.

Results

Results of preliminary comparative studies of human and porcine discs are juxtaposed in TABLE 1, presenting average thicknesses and relative indentation depths, determined as a relation between the penetrator's indentation depth and disc thickness within the examined area.

Analizo- wane	Gru Thi [ubość / ckness mm]	Zagłębienie względne penetratora / Penetrator's relative indentation [%]		
Analyzed spot	Ludzki Wieprzowy krążek / krążek / Human Porcine disc disc		Ludzki krążek / Human disc	Wieprzowy krążek / Porcine disc	
A	2,7	2,9	6,3	4,9	
Р	3,2 4,4		4,1	4,2	
C	0,9	1,3	12,3	9,7	

TABELA 1. Porównanie grubości ludzkich i wieprzowych krążków stawowych oraz ich odkształceń względnych przy nacisku punktowym. TABLE 1. Comparison of human and porcine joint discs' thicknesses and their relative deformations under spot pressure.

Thickness measurements indicate that, despite the porcine disc's larger mass, its shape is similar to the humane disc. Both human and porcine discs display strengthening of anterior and posterior portions, with the posterior part being thicker and more rigid than the anterior portion. The central and side parts of the disc are substantially thinner and more susceptible to loads, as shown by the relative deformation analysis.

During investigations of the discs, the hysteresis loops were stabilized after the 5th cycle of loading. Example charts presented in FIGURE 2.

The basic examination result was rigidity in the investigated objects, calculated using a ratio of pressure force to displacement F/ Δ I, and Young's modulus [4]. Complementary information, illustrating the course of dissipation processes, includes the total deformation range for cycle $\Delta\epsilon_c$ and the deformation $\Delta\epsilon_d$ characterizing the width of hysteresis loop. TABLE 2 presents the experimental results, being the average value from three measurements made on tissues sampled from different animals.

BI MATERING OF



RYS.2. Przykładowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe uzyskane dla tylniej-P, przedniej-A i środkowej-C, części krążka dla próbek wycinanych (s), krążka z przerwaną ciągłością tkanek (d_c) i dla całego nieuszkodzonego krążka (d).

FIG.2. Example stress and deformation characteristics obtained for P (posterior), A (anterior) and C (central) parts of a disc for: cut-out samples, a disc with interrupted tissue continuity and for a complete, undamaged disc.

Miejsce badania / Examined spot	Rodzaj próbki / Sample type	Nr cyklu / Cycle number	Sztywność / Rigidity [N/mm]	Zakres odkształcenia cyklu Δε _c / Deformation range in cycle Δε _c [%]	Szerokość pętli histerezy, Δε _σ / Hysteresis loop width Δε _d , [%]	Moduł elastyczno- ści / Young's modulus [MPa]
Tył krażka /	Sample's graph / Próbka wykr.	5	117,9	3,7	0,6	12,56
Posterior part of disc	Incised disc / Krążek nacięty	5	88,8	3,8	1,2	4,53
	Complete disc / Cały krążek	5	87,1	7,8	2,5	4,44
Przód krażka /	Sample's graph / Próbka wykr.	5	97,3	6,4	0,8	7,25
Anterior part of	Incised disc / Krążek nacięty	5	64,3	8,1	2,8	3,28
disc	Complete disc / Cały krążek	5	58,8	11,4	2,9	2,99
Środek krążka / Central part of	Sample's graph / Próbka wykr.	5	87,9	4,7	1,6	6,99
	Incised disc / Krążek nacięty	5	70,6	7,6	1,4	3,6
aisc	Complete disc / Cały krążek	5	38,7	11,1	2,7	1,97

TABELA 2. Średnie wartości sztywności, zakresy odkształceń, moduły elastyczności oraz procentowy ubytek wagi próbek wycinanych w piątym cyklu badania.

TABLE 2. Average rigidity values, ranges of deformation, elasticity moduli and percentage weigh loss of cutout samples.

Wnioski

Wycinanie próbek lub przerwania ciągłości tkanek krążka powoduje zawyżenie wyznaczanych wielkości modułów elastyczności. Ze względu na zmienność cech geometrycznych i materiałowych nie powinno się określać własności tkanek krążka podczas typowej próby statycznego ściskania. Wskazane jest kilkukrotne powtórzenie cyklu obciążania. Za ustabilizowany można uznać dopiero piąty cykl obciążenia.

Conclusions

The results obtained in this study allow us to conclude that when testing elasticity, a greater error is caused by interrupting the tissue continuity than by disregarding the influence of material's continuity when loading an undamaged disc locally.

Due to variability of the characteristics during consecutive load cycles, the disc's properties identified in a typical static compression test should not be taken into account in model research of joint's load. Only the fifth loading cycle may be considered stabilized.

References

[5] Tanaka E., Eijden T.: Biomechanical behavior of temporomandibular joint disc. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 14(2), 2003, 138-150.
[6] Allen K. D., Athanasiou K. A.: Viscoelastic characterization of the porcine temporomandibular joint disc under unconfined compressions. Journal of Biomechanics, 2006, 312-322.

[7] Chin L. P. Y., Aker F. D., Zarrinnia K.: The Viscoelastic Properties of the Human Temporomandibular Joint Disc. J. Oral Maxillofac Surg. 54, 1996, 315-318.

Piśmiennictwo

[1] Okeson J.P.: Leczenie dysfunkcji narządu żucia i zaburzeń zwarcia. Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2005.

[2] Mov V. C., Huiskes R.: Basic Orthopaedic biomechanice and Mechano-Biology. Lippincott Williams and Wilkins, 2005.

[3] Zhang M., Zheng Y. P., Mak A. F. T.: Estimating the effective Young's modulus of soft tissues from indentation tests-nonlinear finite element analysis of effects of friction and large deformation. Med. Eng. Phys., 1997, Vol. 19, 512-517.

[4] Delafargue A., Ulm F. J.: Explicit approximations of the indentation modulus of elastically orthropic solids for conical indenters. Int. J. of Solids and Structures, 2004, 7351-7360.

PRZECIWBAKTERYJNE WŁAŚCIWOŚCI PROTEZ NACZY-NIOWYCH MODYFIKOWANYCH CEFEPIMEM

MAŁGORZATA MIAZGA-KARSKA¹, GRAŻYNA GINALSKA²

¹ Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, 20-093 Lublin, Polska ² Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej Katedra Biochemii, 20-031 Lublin, Polska E-mail: malina.miazga-karska@wp.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 19-20]

Wprowadzenie

W chirurgii naczyń oprócz auto- i allogennych materiałów stosuje się syntetyczne protezy naczyniowe wykonane z biomateriałów polimerowych (polietylenotereftalanu – PET, polimetylomatakrylanu – PMMA, politetrafluoroetylen PTFE). Przy stosowaniu do implantacji tego typu materiałów istnieje ryzyko pojawienia się bakteryjnych zakażeń pooperacyjnych. W celu zmniejszenia ilości przypadków infekcji na oddziałach chirurgii naczyniowej stosuje się systemową antybiotykoterapię.

Celem naszej pracy było uzyskanie protez o przedłużonej aktywności przeciwbakteryjnej przez utworzenie kowalencyjnego wiązania między lekiem a protezą naczyniową uszczelnianą żelatyną.

Metodyka

Wiązanie cefepimu (cefalosporyna IV generacji) do protez Uni-Graft® (Braun, Niemcy) prowadzono z użyciem aldehydu glutarowego – czynnika tworzącego ramię przestrzenne pomiędzy protezą a lekiem [1]. Ilość leku związanego z nośnikiem oraz wydajność procesu immobilizacji określono metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w opracowaniu własnym. Mikrobiologiczną kontrolę przeciwbakteryjnej aktywności modyfikowanych cefepimem biomateriałów prowadzono w stosunku do szczepów Staphylococcus aureus ATCC 25923, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 i E. coli ATCC 25992.

Wyniki

Przeprowadzone badania analityczne wskazują, że najwyższe wartości wydajności procesu wiązania cefepimu z protezą osiągnąć można, gdy:

• pH środowiska reakcji immobilizacji jest lekko kwaśne lub obojętne;

stosuje się niskie wartości początkowych stężeń leku;

 do aktywacji białkowanej protezy używa się wysokich (powyżej 6%) stężeń aldehydu glutarowego;

• reakcję wiązania cefepimu prowadzi się w temperaturze nie przekraczającej 37°C przez okres co najmniej 2 godzin.

Po tak przeprowadzonej immobilizacji cefepimu wykazano obecność różnych oddziaływań pomiędzy lekiem a protezą typu: adsorpcji fizycznej, wiązań jonowych i silnych wiązań kowalencyjnych. Procentowy ich skład określono przez odmywanie protez w wodzie (wymycie puli leku związanego fizycznie) a następnie w 0,1 M HCI (rozerwanie wiązań jonowych) (RYS.1).

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF VASCULAR GRAFTS MODIFIED WITH CEFEPIME

Małgorzata Miazga-Karska, Grażyna Ginalska

¹ Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Lublin, 20-093 Lublin, Poland ² Department of Biochemistry, Maria Curie-Sklodowska University, 20-031 Lublin, Poland E-mail: malina.miazga-karska@wp.pl

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 19-20]

Introduction

Synthetic vascular prostheses made of polymeric biomaterials (polyethylene terephthalate vascular surgery aside of auto- and allogenous materials – PET, polymethacrylate – PMMA, polytetrafluoroethylene PTFE) are used in vascular surgery. Common use of such biomaterials leads to postoperative bacterial infections. The systemic antibiotic therapy is used to lower the amount of such complications on vascular surgery departments.

The aim of our research was to obtain vascular prostheses with prolonged antibacterial activity by creation covalent bindings between drug and gelatin - sealed vascular prosthesis.

Methods

Immobilization of cefepime (cephalosporin IV gen.) on Uni-Graft® (Braun, Germany) prostheses was performed using glutaraldehyde – factor creating the space-arm between a prosthesis and a drug [1]. The amount of cefepime bound to carrier and immobilization yield was estimated by HPLC technique suitable for our conditions.

The microbiological control of antibacterial activity of cefepim modified biomaterials was performed with use of Staphylococcus aureus ATCC 25923, Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 and E. coli ATCC 25992 strains.

Results

Analytical experiments showed that the highest amount of cefepime bound can be obtained, when:

- pH value of reaction medium is slightly acidic or neutral,
- · low initial concentration of drug is used,
- for activation gelatin-sealed prosthesis is using high concentration of glutaraldehyde (above 6%),
- immobilization process is performing during 2 hours in temperature not above than 37°C.

In next test, after the immobilization, we showed, that cefepime was bound by different types of interactions between prosthesis and drug: physical adsorption, ionic bonds, and strong covalent bonds. The percentage of particular interactions was estimated by washing out: first in water (removal of drug attached by physical adsorption) and next in 0,1 M HCI (disruption of ionic bonds) (FIG.1). It was observed that the biggest amount of interactions were covalent bonds (90%). It is very useful case, because this type of bounds cefepime is the stronger attached and the longer existing on prosthesis, so as a result it gives prolonged antibacterial protection. Hence, antibacterial growth inhibition in solid and liquid medium was observed (TABLE 1, FIG.2, FIG.3).



RYS.1.Procentowy udział wiązań wytworzonych między protezą a cefepimem. FIG.1. The percentage particular interactions of cefepim with prosthesis.

ał hybrydowy / biomaterial wiązań / interactions		Strefy zaham- owania wzrostu / Jones of bacterial growth inhibition [mm]			llość bakterii po 25 dniach / Amount of bacteria atter 25 days of incubation [CFU/ml]		
Biomateria Hybryd	Biomateria Hybryd I Typ v Kind of i		S. epidermidis	S.aureus	E.coli	S. epidermidis	S.aureus
Cefaklor + gel- PET	Adsorpcja + jonowe + kowalencyjne / Adsorption + ionic + covalent	36	22	32	0	0	0
	Jonowe + kowalencyjne / lonic + covalent	31	18	17	0	0	0
	kowalencyjne / covalent	0	0,1	0,2	3x10 ³	1x10 ²	0

TABELA 1. Efekty przeciwbakteryjnego działania protez naczyniowych zmodyfikowanych cefepimem w hodowlach płynnych i stacjonarnych. TABLE 1. Antibacterial effect of modified with cefepim prostheses in solid and liquid medium.

Stwierdzono, że wiązania kowalencyjne stanowią zdecydowaną większość (90%) całej puli oddziaływań. Jest to bardzo korzystne, bo właśnie ta pula leku będąca najmocniej, a przez to i najdłużej związana z protezą zapewnia przedłużoną w czasie ochronę przeciwbakteryjną. Zatem ocenie poddano hamowanie wzrostu bakterii w podłożu płynnym i agaryzowanym otaczającym zmodyfikowane cefepimem protezy naczyniowe (TAB.1, RYS.2, RYS.3).

Wniosek

Powyższe testy dowiodły, że protezy naczyniowe modyfikowane cefepimem hamują wzrost badanych szczepów Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis i E. coli przez okres co najmniej 25 dni trwania eksperymentu.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2 PO5B 067 30.



RYS.2. Strefy zahamowania wzrostu jako przejaw aktywności przeciwbakteryjnej modyfikowanych cefepimem protez naczyniowych; 1.antybiotyk związany z protezą, w sposób mieszany: bierny, jonowy, kowalencyjny 2.antybiotyk związany z protezą w sposób jonowy i kowalencyjny, 3.antybiotyk związany z protezą kowalencyjnie.

FIG.2. Zones of bacterial growth inhibition as an antibacterial effect of modified biomaterial activity; 1.antibiotic bounded via adsorption, ionic and co-valent interactions, 2.antibiotic bounded via ionic and covalent interactions, 3.antibiotic bounded via covalent interaction.



RYS.3. Ocena tworzenia biofilmu bakteryjnego jako przejaw działalności przeciwbakteryjnej modyfikowanych biomateriałów FIG.3. Biofilm formation as a antibacterial effect of modified biomaterial.

Conclusion

All above experiments showed, that growth of Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and E. coli strains is inhibited for at least 25 days with cefepime modified vascular grafts.

Acknowledgements

This work was supported by Polish grant No2 P05B 067 30, financed by the Minister of Science and Higher Education.

Piśmiennictwo

[1]. Hermanson G.T, Mallia A.K, Smith P.K. (1992), Immobilized affinity ligand techniques Academic Press, INC.

References

OPTYMALIZACJA WARUNKÓW UNIERUCHAMIANIA SPARFLOKSACYNY NA BIOMATE-RIAŁACH WYKONANYCH Z POLITEREFTALANU ETYLENU

Małgorzata Miazga-Karska¹, Grażyna Ginalska¹, Monika Osińska-Jaroszuk²

¹ Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna,
 20-093 Lublin, Polska
 ² Zakład Biochemii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej,
 20-031 Lublin, Polska
 E-mail: malina.miazga-karska@wp.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 21-22]

Wstęp

Istotnym zagrożeniem wynikającym z zastosowania w zabiegach chirurgii naczyniowej biomateriałów wykonanych z politereftalanu etylenu (PET) jest pojawianie się zakażeń. Spowodowane są one głównie kontaminacją podczas operacji oraz wysokim powinowactwem bakterii Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus i Escherichia coli do tego typu materiałów [1]. W celu zmniejszenia ryzyka takich infekcji stosuje się modyfikacje biomateriałów substancjami bakteriobójczymi.

Cel pracy

Głównym celem pracy była optymalizacja warunków wiązania sparfloksacyny do protez naczyniowych Tricogel® i Uni-Graft® wykonanych z PET i wykorzystywanych w chirurgii naczyń.

Metodyka

Wiązanie sparfloksacyny do protez Tricogel® (Tricomed, Polska) i Uni-Graft® (Braun, Niemcy) prowadzono z użyciem aldehydu glutarowego – czynnika tworzącego ramię przestrzenne pomiędzy protezą a lekiem. Immobilizację sparfloksacyny na wybranym nośniku prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w zgłoszeniu patentowym [2]. Ilość leku związanego z nośnikiem oraz wydajność procesu immobilizacji określono metodami spektrofotometrycznymi w opracowaniu własnym. Mikrobiologiczną kontrolę aktywności modyfikowanych hybryd (proteza-lek) testowano w stosunku do szczepu E. coli ATCC 25992.

Badania własne

Na podstawie przeprowadzonych testów wstępnych stwierdzono możliwość wiązania sparfloksacyny za pomocą aldehydu glutarowego do testowanych biomateriałów. W następnej kolejności dokonano doboru odpowiedniego rodzaju i pH środowiska reakcji wiązania leku do protez PET (TABELA 1). Najlepsze rezultaty wiązania leku do obydwu testowanych materiałów (Tricogel® i Uni-Graft®) uzyskano stosując bufor Sörensena o pH 7,4.

Następnie sprawdzono zależność wydajności procesu immobilizacji od stężenia aktywatora – aldehydu glutarowego (GA). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia tego aktywatora rośnie ilość związanego z testowaną protezą antybiotyku oraz wydajność procentowa immobilizacji (RYS.1).

OPTIMIZATION OF SPARFLOXACIN IMMOBILIZATION CONDITIONS ON POLYETHYLENE TEREPHTHALATE BIOMATERIALS

Małgorzata Miazga-Karska¹, Grażyna Ginalska¹, Monika Osińska-Jaroszuk²

¹ Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Lublin, 20-093 Lublin, Poland ² Department of Biochemistry, Maria Curie-Sklodowska University, 20-031 Lublin, Poland E-mail: malina.miazga-karska@wp.pl

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 21-22]

Introduction

The important problems are appearing while using in vascular surgery polyethylene terephthalate (PET) biomaterials postoperative bacterial infections. They are caused by contamination during operation and bacterial (Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus i Escherichia coli) adhesion with such type of biomaterials [1]. To avoid such infections, biomaterials are modified with antibacterial substances.

Research aim

The aim of our research was optimization of sparfloxacin immobilization conditions with vascular prosthesis Tricogel® i Uni-Graft® made by PET and used in vascular surgery.

Methods

The sparfloxacin immobilization process with prostheses Tricogel® (Tricomed, Poland) i Uni-Graft® (Braun, Germany) was performed using glutaraldehyde – the reagent created space-arm between prosthesis and drug. Immobilization process of sparfloxacin on selected biomaterials was performed according to procedure described in our Patent [2]. The amount of drug bound to biomaterial and immobilization yield was estimated according to spectrophotometric method suitable for our conditions. Microbiological tests of activity of hybrid (prosthesis – drug) were performed using E. coli ATCC 25992 strain.

Results

On the basis of our investigation it was found, that sparfloxacin binds by glutaraldehyde to all tested vascular biomaterials. Next, the type of buffer and its pH value for sparfloxacin binding to PET prostheses were optimized (TABLE 1). The best result of immobilization process for two examined biomaterials (Tricogel® and Uni-Graft®) were obtained for Sörensen buffer pH 7,4. Next, the correlations between immobilization yield and concentration of activator factor - glutaraldehyde (GA) was tested. It was observed, that the higher was used this concentration, the higher was the amount of bound antibiotic also higher was immobilization yield (FIG.1). Additionally in next experiment it was observed, that the higher was the amount of initial sparfloxatin concentration the higher was the amount of bound drug, but lower was immobilization yield. The similar effect of this type of dependence was obtained for sparfloxacin binding with Tricogel® and Uni-Graft® prostheses as well (TABLE 2).

Dodatkowo, w kolejnym doświadczeniu zaobserwowano, że wraz ze wzrostem wyjściowego stężenia sparfloksacyny rośnie ilość unieruchomionego leku, maleje zaś wydajność immobilizacji. Analogiczny efekt powyższej zależności osiągnięto w przypadku łączenia leku zarówno do protez Tricogel® jak i Uni-Graft® (TAB.2).

Wnioski

Rodzaj 0,1M buforu , Kind of 0,1 M buffer

fosforanowy

Söense

PBS

na

Ηd

6.0

7,0

8,0

5,0

6,0

7,4

6,0

7,0

7,4

Tricogel®

7,8

12,2

9,12

9,72

11,73

14,4

6,2

10.4

9,3

/ith

UniGraft®

6,88

11,42

10

7,9

10,28

14,56

6,48

10,96

11,02

TABELA 1. Dobór optymalnego pH środowiska do

immobilizacji sparfloksacyny na protezach PET.

TABLE 1. Optimization of type of medium pH for sparfloxacin immobilization on PET prostheses.

Stwierdzono możliwość wiązania sparfloksacyny za pomocą aldehydu glutarowego do biomateriałów Tricogel® i Uni-Graft®. W celu zwiększenia ilości sparfloksacyny związanej z badaną protezą, dokonano optymalizacji warunków jej unieruchamiania. Ustalono korzystny wpływ na proces immobilizacji: środowiska obojętnego (pH do 7,4) oraz wykazano zależność wydajności procesu od malejących stężeń leku stosowanego do immobilizacji jak i zależność wydajności od wzrastających stężeń aktywatora aldehydu glutarowego. Korzyst-

dniach

E. coli growth after 28 days CFU/ml

Tricogel®

0

0

0

0

0

0

0

0

0

ய்ய்

Nzrost

UniGraft®

0

0

0

0

0

0

0

0

0

Nydajność immobilizacji Immobilization yield (%)

Tricogel®

22,8

35,2

26,76

33,0

38,5

47,2

24,2

31,8

27,0

UniGraft®

20,2

33,5

29,4

26

34,4

48,2

21,2

34,44

34,6

RYS.1. Optymalizacja stężenia aldehydu glutarowego (GA) stosowanego w procesie immobilizacji sparfloksacyny na protezach Tricogel® i Uni-Graft®

FIG.1. Optimization of glutaraldehyde (GA) concentration for immobilization of sparfloxacin process on Tricogel® i Uni-Graft® prostheses.

ne jest prowadzenie immobilizacji powyżej 2 godzin w temperaturze nie przekraczającej 37°C (dane nie zamieszczone w pracy). Stwierdzono że taki sposób unieruchamiania leku skutkuje wytworzeniem hybryd o przedłużonej do 28 dni ochronie przeciwbakteryjnej w stosunku do E.coli.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr T09B05229, finansowanego przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.



TABELA 2. Optymalizacja stężenia sparfloksacyny w procesie immobilizacji na protezach Tricogel® i Uni-Graft®

TABLE 2. Optimization of sparfloxacin concentration for immobilization process on Tricogel® and Uni-Graft® prostheses.

Conclusions

It was found that sparfloxacin binds to Tricogel® and Uni-Graft® biomaterials using glutaraldehyde. The immobilization conditions have been optimized to obtaining higher amount of sparfloxacin bound with examined prosthesis. Positive influence for immobilization process

> have: - neutral medium (pH to 7,4), - dependence of immobilization yield on glutaraldehyde's higher concentrations. Performing the immobilization process for more then 2 hours in temperature less then 37°C (data not shown) is positive.

Acknowledgements

This work was supported by Polish grant No T09B05229, financed by the Minister of Science and Higher Education.

Piśmiennictwo

References

[1]. Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M., (2004) Patent nr p-358934

[2]. Hernández-Richter, H.M. Schardey, F.Wittmann, S. Mayr, M. Schmidtt-Sody, S. Blasenbreu, M.M. Heiss, C. Gabka, M.K. Angele, Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 26 (2003) 550-557.

OCENA MOŻLIWOŚCI IMMOBILIZACJI FLUOROCHINOLONÓW DO POLITEREFTALANU ETYLENU

Monika Osińska-Jaroszuk¹, Grażyna Ginalska², Małgorzata Miazga**-K**arska²

¹Zakład Biochemii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, 20-031 Lublin, Polska ²Katedra i Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, 20-031 Lublin, Polska E-mail: moniosi@poczta.onet.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 23-24]

Polietereftalan etylenu należy do grupy biomateriałów poliestrowych wykorzystywanych w kardiochirurgii naczyniowej między innymi do produkcji syntetycznych protez naczyniowych. Istotnym zagrożeniem wynikającym z zastosowania tego typu biomateriałów w zabiegach chirurgii naczyniowej jest pojawianie się wczesnych bądź późnych zakażeń, które z kolei mogą prowadzić do amputacji kończyny bądź zgonu pacjenta. Obecnie, znane metody zapobiegające tego typu powikłaniom ograniczają się do zastosowania protez naczyniowych nasączanych odpowiednim antybiotykiem, bądź powlekanych solami srebra. Implanty tego typu odznaczają się jednak słabymi właściwościami bakteriobójczymi i nie zapewniają skutecznej ochrony protez przed infekcjami bakteryjnymi [1-3].

Głównym celem pracy było sprawdzenie możliwości wiązania chemioterapeutyków należących do grupy fluorochinolonów (pefloksacyna, sparfloksacyna i cyprofloksacyna) do protez naczyniowych wykonanych z politereftalanu etylenu wykorzystywanych w chirurgii naczyń.

Immobilizację pefloksacyny, sparfloksacyny i cyprofloksacyny do protezy naczyniowej Tricogel® (Tricomed, Polska) przeprowadzono z zastosowaniem czynnika wiążącego 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropylo) karbodiimidu. Sprawdzono dwie metody wiązania fluorochinolonów: 1) polegającą na utworzeniu aktywnych grup –C=O na powierzchni biomateriału, oraz 2) polegającą na aktywacji karbodiimidem odpowiedniego chemioterapeutyku. Dodatkowo zastosowano klasyczną metodę nasączania protez wybranymi fluorochinolonami. Ilość poszczególnych specyfików związanych do biomateriału oraz wydajność procesu immobilizacji określono metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w opracowaniu własnym. Otrzymane wyniki przedstawia TABELA 1 i 2.

Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wiązania pefloksacyny i cyprofloksacyny tylko po zastosowaniu metody wiązania polegającej na aktywacji biomateriału karbodiimidem. Pozostałe badane metody wiązania uniemożliwiają skuteczne unieruchamianie wszystkich badanych fluorochinolonów. W przypadku sparfloksacyny stwierdzono brak możliwości skutecznej immobilizacji leku bez względu na rodzaj zastosowanej techniki wiązania. W następnym etapie badań sprawdzono działanie bakteriobójcze fluorochinolonów unieruchomionych metodą I na protezie naczyniowej. Na podstawie otrzymanych wyników (TABELA 3) stwierdzono zahamowanie wzrostu testowanych szczepów bakterii (E. coli, S. aureus i P. aeruginosa) wobec biomateriałów modyfikowanych pefloksacyną i cyprofloksacyną, w przeciwieństwie do protez zawierających związaną sparfloksacynę.

W kolejnym etapie badań określono właściwości antybakteryjne, pefloksacyny związanej z protezą naczyniową inkubowaną w pożywce płynnej LB w czasie 7 dni.

ESTIMATION OF POSSIBILITY OF FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS IMMOBILIZATION TO POLYETHYLENE TEREPHTHALATE

Monika Osińska-Jaroszuk¹, Grażyna Ginalska², Małgorzata Miazga-Karska²

¹ Department of Biochemistry, Maria Curie-Sklodowska University, 20-031 Lublin, Poland ² Chair and Department of Biochemistry, Medical University of Lublin, 20-093 Lublin, Poland E-mail: moniosi@poczta.onet.pl

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 23-24]

Polyethylene terephthalate belongs to the group of polyester biomaterials used in vascular cardiosurgery for different purposes including the production of synthetic vascular prostheses. The serious disadvantage of these prostheses is the risk of early and high infections after their surgical implantations, which may result in limb amputation or even patients' death. Commonly known methods used for the infection prevention include the impregnation with silver salts or soaking with antibiotics solutions. Such implants, however, reveal only weak antibacterial activities and do not prevent the prostheses effectively against bacterial infections [1-3].

The aim of the research was the verification of possibility of fluoroquinolone chemotherapeutics (pefloxacin, sparfloxacin, ciprofloxacin) immobilization to polyethylene terephthalate vascular prostheses used in vascular surgery.

Immobilization of pefloxacin, sparfloxacin and ciprofloxacin to vascular prosthesis Tricogel® (Tricomed, Poland) was performed using 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide as a binding factor. Two methods of fluoroquinolones binding were tested: 1) creation of active –C=O groups on biomaterial surface 2) activation of an appropriate drug with carbodiimide. Moreover, classical method of soaking the prostheses with the fluoroquinolone solution was used. Amount of the chemicals bound to the biomaterial and immobilization yield were estimated on a base of HPLC technique with some modifications. The results are presented in TABLE 1 and 2.

The results showed the possibility of pefloxacin and ciprofloxacin binding to the prostheses only via carbodiimide activation method. Other tested methods of biomaterial activation were found to be ineffective for fluoroquinolones binding. In case of sparfloxacin, the drug was found to be unsusceptible for immobilization regardless of the binding technique.

Antibacterial activity of fluoroquinolones immobilized to prosthesis according to the method I was tested against E. coli, S. aureus i P. aeruginosa bacterial strains. According to the results presented in TABLE 3, the growth of all tested strains was inhibited by pefloxacin and ciprofloxacin but not sparfloxacin immobilized on vascular prostheses.

Antibacterial activity of pefloxacin immobilized according to the method I was tested also in liquid LB medium while incubated for 7 days. Bactericidal effect was measured as a function of increase of medium turbidity at OD550nm. It was shown that tested bacterial strain growth was inhibited in presence of pefloxacin-modified vascular prosthesis in opposite to control non-modified prosthesis without the drug (TABLE 4, FIG.1).

Summarizing the conclusions: Immobilization of pefloxacin and sparfloxacin to polyethylene terephthalate vascular prostheses via the biomaterial activation by carbodiimide is possible.

Metoda wiązania /		Pefloksacyna Pefloxacin	Sparfloksacyna Sparfloxacin	Cyprofloksacyna Ciprofloxacin			
E	sinaing methoa	Wydajność im	Wydajność immobilizacji / Immobilization yield (%)				
I	karbodiimid + proteza / carbodiimide + prosthesis	60,2	0,2	49,6			
Ш	karbodiimid + flurochinolon / carbodiimide + fluoroquinolone	0,6	0,15	0,14			
Ш	nasączanie / soaking	0,5	0,1	0,09			

TABELA 1. Rezultaty wydajności immobilizacji wybranych fluorochinolonów do poliestrowych protez naczyniowych Tricogel®. TABLE 1. Field of immobilization of tested fluo-

roquinolones on poliester vascular prosteheses Tricogel®.

Szczep	Strefy zahamowania wzrostu / Growth inhibition zones [mm]				
bakteryjny / Bacterial strain	Pefloksacyna pefloxacin	Sparfloksacyna sparfloxacin	Cyprofloksacyna ciprofloxacin		
Escherichia coli ATCC 25922, MIC < 5μg	43	0	30		
Staphylococcus aureus ATCC 25923, MIC < 5µg	30	0	23		
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, MIC 5-10μg	29	0	24		

TABELA 3. Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla fluorochinolonów immobilizowanych z protezą Tricogel® metodą I (karbodiimid-proteza). TABLE 3. Zones of inhibition of bacterial growth for fluoroquinolones immobilized on Tricogel® vascular prosthesis according to the method I (carbodiimide-prosthesis).

Efekt bakteriobójczy określano przez pomiar zmętnienia OD550nm. Wykazano brak wzrostu badanych szczepów bakteryjnych w obecności modyfikowanej pefloksacyną protezy naczyniowej w przeciwieństwie do protez kontrolnych nie posiadających związanego leku. (TABELA 4; RYS.1).

Reasumując: wykazano możliwość immobilizacji pefloksacyny i cyprofloksacyny do protez naczyniowych wykonanych z polietereftalanu etylenu metodą polegającą na aktywacji biomateriału karbodiimidem. Biomateriały zawierające tak związane chemioterapeutyki wykazywały skuteczną ochronę przeciwbakteryjną. Pozostałe metody wiązania nie wykazywały zadawalającego poziomu wiązania badanych fluorochinolonów.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu badawczego Nr T09B05229, finansowanego przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Metoda wiązania /		Pefloksacyna Pefloxacin	Sparfloksacyna Sparfloxacin	Cyprofloksacyna Ciprofloxacin			
Ŀ	Binding method	llość związane	llość związanego leku / Amount of bound drug (mg/g)				
I	karbodiimid + proteza / carbodiimide + prosthesis	8,0	0,026	6,5			
=	karbodiimid + flurochinolon / carbodiimide + fluoroquinolone	0,07	0,019	0,018			
Ш	nasączanie / soaking	0,06	0,013	0,012			

TABELA 2. Rezultaty ilości związanego leku do poliestrowych protez naczyniowych Tricogel®. TABLE 2. Amounts of the drug bound to poliester vascular prostheses Tricogel®.

Szczep /	Dawka infekcyjna /	Proteza /	% OD _{550nm}		
strain	(CFU/mL)	Prosthesis	1 dzień / 1¹day	dzień / 7¹day	
Escherichi coli ATCC 25922	1 x 104	Kontrola / Control PET + pefl.	0,33 0	0,53 0	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	1 x 104	Kontrola / Control PET + pefl.	0,28 0	0,56 0	
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	1 x 104	Kontrola / Control PET + pefl.	0,18 0	0,46 0	

TABELA 4. Ocena wzrostu bakterii na podstawie pomiaru OD550nm w obecności protez: kontrolnej i zawierającej związaną pefloksacynę. TABLE 4. Estimation of bacterial growth (turbidity

measurement at OD550nm) in presence of prostheses: control and containing immobilized pefloxacin.



RYS.1. Zdjęcie ilustrujące strefy zahamowania wzrostu E. coli, P. aeruginosa i S. aureus na podłożu Mueller-Hinton w obecności protez Tricogel® zmodyfikowanych pefloksacyną (metoda I). FIG.1. Inhibition of E. coli, P. aeruginosa and S. aureus growth on Mueller-Hinton agar medium in presence of Tricogel® prosthese modified with pefloxacin (method I).

The biomaterials containing such immobilized antibiotics revealed the effective antibacterial properties. Other binding methods did not provide satisfactory results of tested fluoroquinolones immobilization to vascular prostheses.

Acknowledgements

The work was supported by polish Grant of Ministry of Science and Higher Education No T09B05229.

Piśmiennictwo

 F. Sardelic, P.Y. Ao, D.A. Taylor, J.P. Fletcher, Prophylaxis against Staphylococcus epidermidis vascular graft infection with rifampicin – soaked, gelatin-sealed Dacron, Cardiovasc. Surgery 4 (1996) 389-392.
 A. Haverich, S. Hirt, M. Karak, F. Sialari, H. Wahling, Prevention of graft infection by bonding gentamicin to dacron prostheses, J. Vasc. Surg. 15 (1998) 187-193. [3] T. Hernández-Richter, H.M. Schardey, F.Wittmann, S. Mayr, M. Schmidtt-Sody, S. Blasenbreu, M.M. Heiss, C. Gabka, M.K. Angele, Rifampin and Triclosan but not silver is effective in preventing bacterial infection of vascular dacron graft material. Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 26 (2003) 550-557.

ANALIZA MECHANICZNO-ELEKTROCHEMICZNA ANODO-WEJ WARSTWY WIERZCHNIEJ NA STOPIE Ti6AI4V ELI

Agnieszka Kierzkowska, Elżbieta Krasicka-Cydzik

UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI, UL. PODGÓRNA 50, 65-246 ZIELONA GÓRA

Słowa kluczowe: stop tytanu, warstwa tlenkowa, anodowanie, gięcie, elektrochemia

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 25-28]

Wprowadzenie

Warstwy tlenkowe na tytanie i jego implantowych stopach odpowiadają za odporność korozyjną i biotolerancję hamując anodowe roztwarzanie materiału podłoża [1-3]. Według [4] są inhibitorem procesu uwalniania jonów, a następnie ich przemian w roztworach fizjologicznych w warunkach in vitro. Porowate warstwy tlenkowe na tytanie sprzyjają ponadto osteointegracji [5,6]. Różnorodność barw [7,8] uzyskiwanych podczas procesu anodowania usprawnia proces implantacji, a w przypadku narzędzi chirurgicznych informuje o poziomie ich zużycia [8]. Ochraniające działanie warstwy wierzchniej na stopie tytanu może być zaburzone w wyniku jej mechanicznego uszkodzenia i braku ciągłości [9]. Z jednej strony mówi się w literaturze o poważnych konsekwencjach uwalniania jonów metalowych do organizmu [9,10], z drugiej o szybkim czasie repasywacji uszkodzeń w kontakcie z tlenem, który na przykład dla stopu Ti6Al4V w 0,9% płynie fizjologicznym wynosi 8,2min [4]. Odkształcanie stopu tytanu wynikające często z konieczności śródoperacyjnego modelowania i dopasowywania do cech anatomiczno-fizjologicznych pacjenta, jest przyczyną uszkodzeń warstwy, szczególnie w strefie występowania największych odkształceń [11].

Materiały i metody

Badania elektrochemiczne były prowadzone na próbkach ze stopu tytanu Ti6Al4V (skład chemiczny: C: 0,08 wt.%, O: 0,2, H: 0,015, V: 3,95, Al: 6,20, pozostałe pierwiastki 0,3, wano warstwą anodową w roztworze H₃PO₄ wg patentu PL 185176, a następnie odkształcano z zachowaniem analogii do sposobu śródoperacyjnego kształtowania prętów. Stan warstwy wierzchniej charakteryzowano chropowatością powierzchni. Zmiany własności elektrochemicznych oceniano na podstawie pomiarów potencjałów korozyjnych Ekor, charakterystyk polaryzacyjnych oraz elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej (EIS). Trwałość warstwy anodowej badano w roztworze Ringera, natomiast bioaktywność in vitro oceniano podczas przechowywania w sztucznym płynie fizjologicznym (SBF) oraz w hodowli z ludzkimi osteoblastami. Obserwacje mikroskopowe (SEM), mikroanalize pierwiastków (EDS) oraz analizę fazową (XRD) wykorzystano do oceny wpływu odkształcenia na pokrywanie się powierzchni składnikami roztworu SBF.

MECHANICAL AND ELECTROCHEMICAL ANALYSIS OF ANODIC SURFACE LAYER ON TITANIUM ALLOY TI6AI4V ELI

Agnieszka Kierzkowska, Elżbieta Krasicka-Cydzik

UNIWERSITY OF ZIELONA GORA, UL. PODGORNA 50, 65-246 ZIELONA GORA

Keywords: titanium alloy, anodic layer, anodizing, bending, electrochemistry

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 25-28]

Introduction

Oxide layers on titanium and titanium alloys are responsible for corrosion resistance and biotolerance, inhibiting anodic dissolution of material [1-3]. According to [4] the oxide layers inhibit ions release and prevent their further reactions in vitro and in vivo. Moreover, this oxide favours osteointegration [5,6]. A variety of colours [7,8] obtained during the anodizing easies the implantation process and in case of using sharp tools indicates about their wear [8]. The protective effect of the surface layer on the titanium alloy may be disturbed as a result of its mechanical damage and breaking of continuity [9]. On the one hand it is said in literature that there are severe consequences of the ions release into organism [9, 10], on the other hand a short time of damage repassivation in contact with oxygen is described in literature, which for example for the Ti6Al4V alloy in 0.9% body fluid is 8.2min [4]. The deformation of titanium alloy resulting from the necessity of intrasurgical modelling and adjusting to anatomical and physiological characteristics of a patient, is an often cause of surface layer damages, particularly in the maximum deformation zone [11].

Materials and methods

The specimens of 6mm diameter were used in carried out studies. The samples were anodized in H₃PO₄ solution according to the Polish patent PL 185176. Bending was performed according to intra-surgical procedures applied during shaping of implant rods. The deformed surface layers were characterized by roughness parameters. The electrochemical properties were evaluated on the basis of the corrosion potential values $\mathsf{E}_{\mathsf{corr}}$, the polarization characteristics and the electrochemical impedance spectroscopy (EIS). Protective properties of the anodic layer were tested in Ringer's solution, whereas bioactivity in vitro was estimated after immersing in simulated body fluid (SBF) and in contact with human osteoblasts. The microscopic observation (SEM), the microanalysis of elements (EDS) and the phase analysis (XRD) were used to evaluate an effect of the deformation on coating of the surface layer with SBF solution component deposits.

Results

As expected bending was connected with a local roughness increase [12] and ipso facto with an increase of an active corrosive surface. In certain conditions bending could also cause hydrogen adsorption [13]. The roughness of not deformed and bent at a 10° angle specimen was: R_a <0.17µm and R_z <1.11µm, whereas for higher bending angles 20°,

Gięcie wiązało się z lokalnym wzrostem chropowatości [12] a tym samym wzrostem czynnej powierzchni korodującej, a w określonych warunkach także adsorpcji wodoru [13]. Dla próbki nieodkształconej oraz zgiętej pod kątem 10° chropowatość wyniosła: R_a <0,17µm i R_z <1,11µm, natomiast dla wyższych kątów gięcia 20°, 30° i 20°x2: R_a >0,22µm i R_z >1,39µm.

A. Charakterystyka elektrochemiczna anodowej warstwy wierzchniej po zgięciu

W pierwszym dniu po zanurzeniu w elektrolicie (roztwór Ringe-

ra i SBF) zaobserwowano związek pomiędzy wielkością odkształcenia opisywanego kątem gięcia, a zakresem zmian parametrów elektrochemicznych w obszarze występowania maksymalnych naprężeń rozciągających. Gięcie wpłynęło pierwotnie na pogorszenie właściwości ochronnych warstw prowadząc do obniżenia potencjału korozyjnego, wzrostu gęstości prądu pasywnego z wystąpieniem piku wydzielania tlenu (przy ok. 1,8V NEK) oraz zmiany charakterystycznej dwu-poziomowej struktury (warstwa barierowa/warstwa porowata) na strukture jednopoziomową (tylko warstwa porowata) z mikropęknięciami do podłoża materiału. Charakterystyczne piki prądowe dla próbek odkształconych pod kątem co najmniej 20° wskazują na wydzielanie tlenu bez transpasywnego rozpuszczania stopu tytanu. Brak takich pików na próbkach 0º i 10º z warstwą anodową sugeruje, że tlen wydziela się na pokrywających się naturalnym tlenkiem mikropęknięciach warstwy anodowej spowodowanych odkształceniem plastycznym. Zakres zmian pozwala na wyodrębnienie dwóch różnych rodzajów stanów warstwy po zgięciu (TABELA 1):

 * warstwa anodowa odkształca się i zachowuje ciągłość
 - dla próbek odkształconych pod kątem <20° i dla próbki nie zgiętej 0°;

 * warstwa ulega przerwaniu, występują mikropęknięcia i dochodzi do odsłonięcia metalu - dla próbek odkształconych pod wyższymi kątami 20°, 30° oraz zgiętych dwukrotnie (20°x2).

B. Charakterystyka anodowej warstwy wierzchniej w warunkach *in vitro*

W trakcie przechowywania w roztworze Ringera/SBF ujawnia się występowanie różnych zachowań próbek w zależności od kąta gięcia (TABELA 2). Dochodzi do wyrównywania E_{kor} , prądów korozyjnych oraz odzyskiwania dwu-poziomowej struktury warstwy. Wiąże się to ze spad-

0°, 10°	20°, 30° i 20°x2
Zachowana ciągłość warstwy	Przerwanie ciągłości warstwy
Wysokie wartości potencjałów korozyjnych (E _{kor} > 410 mV NEK)	Niskie wartości potencjałów korozyjnych (E _{kor} <350 mV NEK)
Niskie prądy zakresu pasywnego, brak piku prądowego przy 1800 mV (NEK)	Wysokie prądy w zakresie pasywnym, charakterystyczny pik prądowy przy 1800 mV (NEK)
Struktura dwupoziomowa (EIS)	Struktura jednopoziomowa (EIS)

Tabela 1. Charakterystyka elektrochemiczna anodowej warstwy wierzchniej na próbkach ze stopu tytanu Ti6Al4V ELI po zanurzeniu w elektrolicie. Table 1. Electrochemical characteristics of the anodic surface layer on Ti6Al4V ELI after immersion in electrolyte.



RYS.1. Oddziaływanie mechaniczne na biomateriał. FIG.1. Mechanical influence on a biomaterial. 30^{o} and $20^{o}x2$ roughness amounted to $R_{a}{>}0.22~\mu m$ and $R_{z}{>}1.39\mu m.$

A. The electrochemical characteristics of the anodic surface layer deformed by bending

On the first day after immersion in the electrolyte (Ringer's solution and SBF) the relation between the size of deformation characterized by bending angle and the range of changes of electrochemical parameters in the max tensile stress zone was

observed. There was a clear evidence that bending caused a deterioration of layers' protective properties and led to lowering of the corrosion potential, and a growth of passive current density. The characteristic oxygen evolution peak was seen on anodic polarization curve at about 1.8V NEK and transformation of the typical double-layer structure of the surface film into one-layer structure was observed due to the appearance of microcracks. Characteristic current peaks for samples deformed at least at a 20^s angle showed the oxygen release without the transpassive dissolution of the titanium alloy. The lack of such peaks for the anodised samples bent at 0° and 10° suggests that oxygen evolved on microcracks of the anodic layer, covered with natural oxide, which had been caused by plastic strain. The observed changes allow to distinguish two different kinds of state of the layer deformed by bending (TABLE 1):

* deformed anodic layers which maintain continuity
 – samples deformed at an angle <20°,

* disrupted layers which show microcracks and exposed metal - samples deformed at higher angles 20°, 30° and bent twice (20°x2).

B. The characteristics of the anodic surface layer in conditions *in vitro*

Samples immersed in Ringer's solution/SBF behaved differently according to the bending angle (TABLE 2). After 6 days in SBF solution all samples showed similar values of the corrosion potential Ecorr and corrosion currents. Also the structure of surface layer was reconstructed. For 0^o and 10^o bent samples the E_{corr} drop and the increase of the anodic currents were observed during immersion, whereas the inverse tendency was seen for samples bent at an angle >20°and 20°x2.

0°, 10°	20°, 30° i 20°x2				
Repasywacja uszkodzeń					
Wyrównywanie potencjałów korozyjnych					
<i>E_{kor}</i> (~380 mV NEK)					
Obniżenie prądów anodowych, brak piku prądowego przy 1800 mV					
(NEK)					
Ujednolicanie charakteru warstwy – struktura dwupoziomowa (EIS)					

TABELA 2. Charakterystyka elektrochemiczna anodowej warstwy wierzchniej na próbkach ze stopu tytanu Ti6Al4V ELI podczas przechowywania w elektrolicie.

TABLE 2. Electrochemical characteristics of the anodic surface layer on Ti6Al4V ELI during immersion in electrolyte.

kiem E_{kor} i wzrostem prądów anodowych dla próbek 0° i 10° oraz reakcjami odwrotnymi dla próbek odkształconych pod kątem >20° i przeginanych (20°x2).

Kierunki zmian badanych parametrów elektrochemicznych wskazują na dążenie warstw tlenkowych (ok. 6 dni) do osiągnięcia charakterystycznej dla środowiska "równowagi" (RYS.2), odpowiadającej próbce odkształconej pod kątem 20ş, dla której zanotowano najmniejsze zmiany parametrów elektrochemicznych. Stan ten odpowiada warunkom panującym w środowisku tkankowym, na przykład wartościom potencjałów membranowych tkanek występujących w organizmach żywych, które wynoszą 0,2÷0,45 V [14]. Warstwa zgięta pod kątem 20° charakteryzowała się również najwyższą aktywnością ALP w medium inkubacyjnym z hodowli osteoblastów oraz osiedliło się na niej najwięcej komórek (RYS.3). The direction of changes of tested electrochemical parameters demonstrated that oxide layers after ~6 days in SBF strive to achieve "equilibrium" (FIG.2), which was characteristic for investigated system: sample/solution. The "equilibrium" parameters include electrochemical properties obtained for sample bent at a 20°angle, for which the smallest changes of electrochemical parameters were recorded during deformation. This state corresponds to conditions encountered in tissue environment (values of membrane potentials of tissues in living organisms are $0.2 \div 0.45 V$ [14]). The surface layer on sample bent at a 20° angle was also characterized by the highest ALP activity in the incubation medium from osteoblasts culture, where most cells settled on easily (FIG.3).



RYS.2. Zachowanie in vitro anodowych warstw wierzchnich: a) dla próbek 0° i 10°, b) dla próbek 20°, 30° i 20°x2 (\uparrow rośnie, \downarrow maleje, \leftrightarrow bez zmian, \rightarrow zmienia się na ...) FIG.2. The behaviour in vitro of the anodic surface layers: a) for specimens 0° and 10°, b) for specimens 20°,

30° and 20°x2 (†increase, \downarrow decrease, \leftrightarrow constant, \rightarrow change ...)

Stymulujący skutek polaryzacji zdeformowanej powierzchni (bardziej ujemna niż na próbkach nieodkształconych) i topografii wyrażał się ilością i lokalizacją osadów składników SBF i formowaniem Ca-O-P [15,16]. Nowe pokrycie The stimulating effect of topography and deformed surface polarization (more negative than of the unbent samples) was represented by a quantity and localization of Ca-O-P deposits on the surface [15,16]. The new coating deposited

z drobnokrystalicznego hydroksyapatytu zmniejszyło szkodliwe skutki deformacji implantowego stopu tytanu, w wyniku blokowania porów/mikronierówności przez wydzielenia z roztworu SBF. Powierzchniowa warstwa osadu stała się dodatkową barierą przeciwdziałającą rozpuszczaniu metalu w środowisku tkankowym, a także wpłynęła na zwiększenie ilości osteoblastów, które stymulują osteointegracje na granicy implant-kość.



on the deformed anodic surface layer form finecrystalline hydroxyapatite (XRD) which reduced harmful effects of the deformation of the implant titanium alloy, as a result of blocking the pores of microcracks by deposits. This new deposited surface layer became an additional barrier counteracting the dissolution of metal in the tissue and effected on increased quantity of osteoblasts, which stimulate osteointegration at the implant-bone interface.

RYS.3. Liczba osteoblastów osiedlonych na powierzchni stopu Ti6Al4V po 2 i 6 dniach.

FIG.3. Number of settled osteoblasts on the surface of Ti6Al4V alloy after 2 and 6 days.

Obserwowany podczas badań czas repasywacji uszkodzeń warstwy stopu Ti6Al4V ELI, wynoszący około 6 dni świadczy o dobrych własnościach "naprawczych" uszkodzonej mechanicznie warstwy tlenkowej podczas przechowywania w sztucznym płynie fizjologicznym SBF. Jeśli w ciągu tak krótkiego okresu nie dojdzie w organizmie do odczynu zapalnego tkanek, to warstwa wierzchnia osiągnie potencjały bliskie stanowi równowagowemu, co wiąże się z bezpieczeństwem pełnienia wyznaczonych mu funkcji.

Warto się zastanowić nad wprowadzeniem do procedury operacyjnej etapu związanego z postępowaniem śródoperacyjnym w czasie pomiędzy odkształceniem, a wprowadzeniem do tkanek ludzkich, który nie powinien być krótszy niż kilka minut. Sugeruje się, aby przed wprowadzeniem do organizmu, naruszony mechanicznie stop tytanu umieszczać np. w środowisku sztucznego płynu fizjologicznego SBF o dużej zawartości jonów o korzystnym działaniu na proces repasywacji uszkodzeń (tlenu). Proces ten można również wykorzystać do wprowadzania w anodową warstwę wierzchnią np. leków sterujących leczeniem, w tym osteointegracją.

Należy również pamiętać, że osteointegracja w leczeniu chirurgicznym z użyciem biomateriałów nie zawsze jest zjawiskiem pożądanym. Zatem dyskusja na temat pobudzania zrostu kostnego wymaga ukierunkowanego podejścia na pełnione w organizmie funkcje przez implant oraz uwzględniającego planowany okres stosowania implantu.

Podziękowanie

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2007 jako projekt badawczy (nr 0484/ T02/2006/30).

Summary

The repassivation time of surface damages observed during bending of the anodised Ti6Al4V ELI alloy, which approximates to 6 days, provides evidence of good "repair" properties of the mechanically damaged oxide layer during immersion in simulated body fluid SBF. During that time in absence of inflammation processes in tissue, the deformed surface layer reaches potential close to the equilibrium state, and this is important with regard to safety of performing the assigned functions.

It is worth to discuss the introduction of an additional step into surgical procedure, between deformation and implantation, the step shorter than few minutes. It is suggested that mechanically deformed titanium alloy, before introducing into the organism, should be placed for example in the stimulated body fluid environment (SBF) with large content of ions favourably influencing the repassivation process. This process can also be used to introducing treatmentcontrolling and osteointegration stimulating medicines, into the anodic surface layer.

It is necessary to remember that osteointegration is not always desirable in the surgical treatment. Thus the discussion about stimulation of that process should also consider functions performed by an implant in the organism and a planned period of using an implant.

Acknowledgements

..........

The authors thank the Polish Ministry of Science and Higher Education for the financial support of this work (0484/T02/2006/30).

Piśmiennictwo

[1] I.C. Lavos-Valereto, S. Wolynec; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 15 (2004) 55-59.

[2] J.E.G. González, J.C. Mirza-Rosca; Journal Electroanalytical Chemistry 471 (1999) 109-115.

[3] A. Cigada, M. Cabrini, P. Pedeferri; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 3 (1992) 408-412.

[4] T. Hanawa; Materials Science and Engineering C 24 (2004) 745-752.

[5] I.C. Lavos-Valereto, B. König, C. Rossa, E. Marcantonio, A.C. Zavaglia; Journal of Materials Science: Materials in Medicine 12 (2001) 273-276.

[6] B. Yang, M. Uchida, H-M. Kim, X. Zhang, T. Kokubo, Biomaterials 25 (2004) 1003-1010.

[7] www.kobelco.co.jp/english/titan/fiks/details.pdf.

8. J.M. Beaupre, Patent US 2005/273126.

[9] Marciniak J., Biomateriały. Wyd. Polit. Śl. Gliwice 2002 r. [10] D. M. Grant, W.J. Lo, K. H. Parker, T. L. Parker, Materials in

References

Medicine 7 (1996), 576-584. [11] Ch. Leinenbach, D. Eifler, Biomaterials 27 (2006), 1200-

1208. [12] A. Kierzkowska, E. Krasicka-Cydzik, M. Jenek, Eng.of Bioma-

terials, 47-53 (2005), 146-148. [13] A. Zieliński, Niszczenie wodorowe metali nieżelaznych i ich stopów. Gdańsk 1999.

[14] J. Marciniak, W. Chrzanowski, J. Żak, Eng.of Biomaterials, 30-33 (2003), 56-58.

[15] A. Kierzkowska, E. Krasicka-Cydzik, Eng.of Biomaterials, 58-60 (2006), 136-139.

[16] E. Krasicka-Cydzik, A. Kierzkowska, I. Głazowska, Journal of Achievements in Materials and Manufac. Eng., 17 (2006), 89-92.

WPŁYW PIERWIASTKÓW STOPOWYCH NA ZACHOWANIE SIĘ WARSTWY ANODOWEJ NA IMPLANTOWYCH STOPACH TYTANU W ŚRODOWISKU KWASU FOSFOROWEGO

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, IZABELA GŁAZOWSKA

UNIWERSYTET ZIELONOGÓRSKI, UL. PODGÓRNA 50, 65-246 ZIELONA GÓRA E.KRASICKA@IBEM.UZ.ZGORA.PL

Streszczenie

Wpływ pierwiastków stopowych: Al, V i Nb na zachowanie się warstwy anodowej na implantowych stopach tytanu badano w środowisku 2M roztworu kwasu fosforowego. Próbki polaryzowano potencjodynamicznie od -0,8V(NEK) do 3,0V(NEK) z szybkością 3mVs⁻¹, w czasie 1300s. Na podstawie krzywych polaryzacyjnych stwierdzono, że w trakcie anodowania następuje rozpuszczanie warstwy anodowej na stopie tytanu zawierającym wanad, natomiast na tytanie i stopie tytanu zawierającym niob warstwa anodowa była stabilna.

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 29-31]

Wprowadzenie

Tytan wyróżnia się wśród biometali najlepszą biozgodnością, dobrą bioaktywnością, niskim modułem sprężystości, wysoką odpornością na korozję, korzystnymi właściwościami mechanicznymi przy niskiej gęstości. Niekompletny orbital d w atomie tytanu umożliwia tworzenie stopów na bazie roztworów stałych z większością pierwiastków. Są trzy grupy pierwiastków stopowych [1,2]:

1) stabilizujące fazę α , to jest podwyższające temperaturę przemiany α + β ; do nich należą AI, O, N, C;

2) obniżające temperaturę przemiany $\alpha+\beta$ i stabilizujące fazę β do tego stopnia, że może ona być fazą stabilną w temperaturze otoczenia; są to V, Mo, Ta i Nb;

3) stabilizujące fazę β i powodujące – ze względu na ich malejącą rozpuszczalność z obniżeniem temperatury – wystąpienie przemiany eutektoidalnej; Mn, Fe, Cr, Ni, Cu, Si, Co.

W implantologii znalazły zastosowanie stopy Ti6Al4V ELI [3,4] i Ti6Al7Nb [5] o identycznej zawartości glinu (5,85÷5,90%wag.), natomiast różniące się obecnością wanadu (3,8%wag. w stopie Ti6Al4V ELI) i niobu (6,9%wag. w stopie Ti6Al7Nb), o strukturze dwufazowej α + β . Glin jest pierwiastkiem stabilizującym fazę α , podczas gdy wanad i niob stabilizują fazę β . Ponadto glin i tytan, należące do promotorów pasywności, stanowią główne składniki powierzchniowych warstw tlenkowych stopów, w odróżnieniu od wanadu i niobu, pierwiastków blokujących pasywność i wzbogacających warstwę tlenkową na granicy fazowej z metalem [6].

Skład chemiczny i fazowy tytanu oraz jego dwóch implantowych stopów Ti6Al4V ELI i Ti6Al7Nb umożliwiają dokonanie relatywnej oceny wpływu pierwiastków stopowych na przebieg anodowania stopów oraz właściwości warstw anodowych na podstawie rezultatów badań polaryzacyjnych.

THE INFLUENCE OF ALLOY ELEMENTS ON THE BEHAVIOUR OF THE ANODIC LAYER ON IMPLANT TITANIUM ALLOYS IN PHOSPHORIC ACID SOLUTIONS

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, IZABELA GŁAZOWSKA

UNIVERSITY OF ZIELONA GORA, 50, Podgórna street, 65-246 Zielona Gora, Poland E.Krasicka@ibem.uz.zgora.pl

Abstract

The influence of AI, V, Nb on behaviour of anodic layer on implant titanium alloys in 2M phosphoric acid has been investigated. Samples were linearly polarized from -0,8V(NEK) to 3,0V(NEK) at the rate of 3mVs⁻¹. On the basis of polarization curves, it was observed, that during anodising process a dissolution of anodic layer on the titanium alloy containing vanadium occurs, whereas anodic layer on titanium and titanium alloy containing niobium is stable and resistant to the influence of 2M phosphoric acid.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 29-31]

Introduction

Due to high biocompability and bioactivity, low module of elasticity, high resistance for corrosion, and favourable mechanical properties at low density, titanium is considered as one of the best "biometals". Incomplete orbital d in titanium atom enables to form solid solutions and alloys of titanium with nearly most of the elements. There are three groups of alloy elements:

1) Al, O, N, C, which stabilize the phase α , i.e. rising temperature of α + β transformation;

2) V, Mo, Ta i Nb, which lower temperature of α + β transformation and stabilize phase β to such a level that it could be stable at room temperature;

3) Mn, Fe, Cr, Ni, Cu, Si, Co, which stabilize phase β and cause the eutectoid transformation due to their decreasing solubility with temperature.

Two titanium alloys Ti6Al4V ELI [3,4] and Ti6Al7Nb [5] with the identical content of Al (5,85÷5,90%w.), but with different amounts of other alloying elements - 3,8%w of V in the alloy Ti6Al4V ELI and 6,9%w. of Nb in the alloy Ti6Al7Nb, both having two-phase $\alpha+\beta$ structure are applied as surgical implant materials. Aluminium is an element which stabilizes phase α , while V and Nb stabilize phase β . Moreover, Al and Ti that belong to the group of passivity promoters, are the main components of surface oxide layer. In this regard Al and Ti are different from V and Nb, the elements which block passivity and enrich oxide layer at the phase boundary with metal [6].

Chemical and phase composition of two implant alloys Ti6Al4V ELI and Ti6Al7Nb enables to perform a relative evaluation on the influence of alloy elements on anodising and properties of anodic layers on the basis of results of electrochemical and microscopic tests.

Materials and methodology

.

Samples of titanium and its two alloys Ti6Al4V ELI [3], Ti6Al7Nb) [5] were tested. Samples were cut off from round rods (6 mm of diameter and 20mm of length), polished with carborundum papers 800, rinsed in distilled water, and finally



RYS.1. Typowa mikrostruktura $\alpha+\beta$ stopu Ti6Al4V ELI[4]. FIG.1. Typical microstructure $\alpha+\beta$ of Ti6Al4V ELI alloy [4].

Materiały i metodyka badań

Badano próbki tytanu α , oraz stopów o strukturze (α + β) Ti6Al4V ELI [3], Ti6Al7Nb [5]. Próbki wycięte z wyżarzanych okrągłych prętów (6 mm średnicy i 20mm długości), szlifowano na papierach karborundowych 800, płukano w wodzie destylowanej, następnie polaryzowano potencjodynamicznie od -0,8V (NEK) do 3,0V (NEK) z szybkością 3mVs⁻¹, w 2M H₃PO₄, w ciągu ~1300s. Badania wykonano w konwencjonalnym trójelektrodowym ogniwie, z nasyconą elektrodą kalomelową (NEK), jako odniesienia i blaszką platynową o powierzchni 10cm², jako elektroda pomocnicza.

Wyniki badań i dyskusja

Przedstawione na RYS.2, krzywe polaryzacyjne tytanu i jego stopów w 2M H₃PO₄ różnią się w gałęziach katodowej i anodowej. W początkowym fragmencie krzywej anodowej dla Ti zwraca uwagę charakterystyczna "niecka", która może być wynikiem procesu związanego z adsorpcją anionów. Na krzywej polaryzacyjnej stopu Ti6Al4V ELI występują: przegięcie krzywej katodowej, a bezpośrednio powyżej Ekor "plateau anodowe", które może być spowodowane wpływem inhibitora [7]. Dalej występują rosnące wartości gęstości prądu anodowego w zakresie pasywnym i brak piku związanego z wydzieleniem tlenu na TiO₂. Przyczyną takiego zachowania stopu Ti6Al4V ELI w roztworze H₃PO₄ może być silne oddziaływanie kompleksujące jonów fosforanowych prowadzące do utworzenia AIPO₄ i VOPO₄, z których ostatni wykazuje wysoką przewodność jonowa [8] i właściwości katalityczne [9]. W przeciwieństwie do tlenków innych metali przejściowych, tlenki wanadu roztwarzają się jako jony VO³⁺, co w środowisku H₃PO₄ prowadzi do utworzenia VOPO4. W rozważanym obszarze potencjału ~ -0,5V (NEK) Al ulega roztwarzaniu do jonów Al3+, dajac w środowisku kwasu fosforowego bardzo trudno rozpuszczalny AIPO₄, pK_{il rozp} = 20,01 [1].

Krzywe polaryzacyjne na RYS.2 świadczą również o podobieństwie anodowego zachowania tytanu i stopu Ti6AI7Nb w roztworze H_3PO_4 , które widoczne jest także w analogii charakterystyk impedancyjnych i półprzewodnikowych obu materiałów [1]. Tytan, podobnie jak stop Ti6AI7Nb zachowuje stałe wartości gęstości prądu anodowego w zakresie pasywnym do potencjału ~2,8V (NEK), świadczące o stabilności warstwy anodowej wytworzonej na obu materiałach.

Podobieństwo anodowego zachowania tytanu i stopu Ti6Al7Nb w roztworze H_3PO_4 wynika z natury chemicznej tytanu i niobu. Podobnie jak tytan, niob jest metalem o dużej odporności korozyjnej, którą zawdzięcza podatności pokrywania się warstwą tlenkową Nb₂O₅. Podczas polaryzacji anodowej niob tworzy tlenki NbO i NbO₂ przy potencjale -0,2V (NEK), które następnie utleniane są do Nb₂O₅ przy potencjale +0,2V (NEK) [1]. polarized from -0,8V (NEK) to 3,0V (NEK) with the rate of $3mVs^{-1}$ in 2M H_3PO_4 for 1300s. Tests were carried out in conventional three electrodes cell with saturated kalomel electrode as a reference and platinum plate of surface of $10cm^2$ as a counter electrode.

Results and discussion

Polarization curves and its alloys in 2M H₃PO₄ presented in FIG.2 are different in the cathodic and anodic branches. In the initial part of anodic curve for Ti characteristic "basin", probably a result of process related to adsorption of anions is seen. On the polarization curve for the Ti6Al4V ELI alloy the inflection of the cathodic curve and the "anodic plateau" above E_{cor} linked to the effect of inhibitor [7], are observed. Following this direction, there are increasing values of anodic current density in a passive range and a lack of a peak related to evolution of oxygen on TiO₂ at about 2V (NEK). Such a behaviour of Ti6Al4V ELI alloy in H₃PO₄ solution could be explained by a strong effect of phosphate ions leading to formation of AIPO₄ and VOPO₄. The latter shows high ion conductivity [8] and catalytic properties [9]. Contrary to oxides of other transient metals, vanadium oxides dissolve as VO3+ ions which leads to formation of VOPO₄ in H₃PO₄. In the considered potential region ~-0,5V (NEK) AI dissolves to AI³⁺ ions, forming in the H₃PO₄ difficult to dissolve AIPO₄ (pK_{il diss}. = 20,01), [1].



RYS.2. Krzywe polaryzacyjne tytanu i jego stopów Ti6Al4V ELI oraz Ti6Al7Nb, od -0,8V do 3,0V (NEK) w 2M H₃PO₄, szybkość skaningu 3 mVs⁻¹, 298K. FIG.2. Polarization curves of Ti and its alloys Ti6Al4V ELI and Ti6Al7Nb, from -0,8V to 3,0V (NEK) in 2M H₃PO₄, rate of scanning 3 mVs⁻¹, 298K.

Polarization curves in FiIG.2 prove similarity of titanium and Ti6AI7Nb alloy anodic behaviour in the H_3PO_4 solution. The same analogy is also observed in impedance and semiconductive profiles for both materials [1]. Similarly to Ti6AI7Nb alloy, titanium has stable values of density of anodic current in a passive range to potential ~2,8V (NEK). The similarity of anodic behaviour of titanium and Ti6AI7Nb alloy in the H_3PO_4 solution results from chemical nature of titanium and niobium. Niobium like titanium is the metal with a high corrosion resistance due to easy covering by oxide layer Nb₂O₅. During anodic polarization Nb forms two oxides: NbO and NbO₂ at the potential -0,2V (NEK), which are later oxidized to Nb₂O₅ at the potential +0,2V (NEK) [1].

Bode diagrams for anodic layers of Ti6Al4V ELI alloy [1] illustrate clearly one time constant, typical for a capacity of compact surface layer. As a result of dissolution of vanadium oxides in H_3PO_4 the amount of vanadium is lower in surface layer of alloy than in alloy. This is favourable for implant materials because of a toxic influence of vanadium on human body. Bode diagrams for anodic layers on titanium and Ti6Al7Nb alloy have two time constants, which confirm the

Dla warstw anodowych stopu Ti6Al4V, diagramy Bode'a mają jedną stałą czasową, typową dla pojemności zwartej warstwy powierzchniowej [1]. W efekcie rozpuszczania tlenków wanadu w roztworach H₃PO₄ zawartość tego pierwiastka w warstwie powierzchniowej stopu jest niższa od zawartości w stopie, co potwierdzono także w innych środowiskach. W przypadku materiałów implantowych jest to bardzo korzystne z uwagi na toksyczne oddziaływanie wanadu na organizm człowieka [1]. Diagramy Bode'a dla warstw anodowych tytanu i stopu Ti6Al7Nb posiadają dwie stałe czasowe, świadczące o istnieniu na powierzchni anodowanych materiałów rodzaju dwu-warstwy, złożonej ze zwartych tlenków na granicy z metalem i zaadsorbowanych fosforanów na powierzchni warstwy anodowej kontaktującej się z elektrolitem [1,11].

Przedstawiony na RYS.3 wykres E–pH dla układu Al–P–H₂O opracowany według [10], potwierdza możliwość istnienia trwałego termodynamicznie fosforanu glinu AlPO₄ w warunkach anodowania.

Odpowiedź tkanek na kontakt z powierzchnią Ti6Al4V ELI w badaniach in vitro [12] potwierdza jego większą podatność na korozję w porównaniu ze stopem Ti6AI7Nb. Dodatek niobu do tytanu i zastapienie wanadu niobem w stopach tytanu podwyższa odporność stopu na roztwarzanie w kwasach i polepsza pasywność tytanu. Związane to jest z wprowadzeniem niobu pierwiastkowego oraz wzbogaceniem warstwy tlenkowej tytanu w tlenek Nb₂O₅ w wyniku preferencyjnego roztwarzania tytanu. Według [13] korzystny wpływ dodatków niobu polega na tworzeniu silnych połączeń kowalencyjnych na bazie niesparowanych elektronów orbitalu d przez sąsiadujące w układzie okresowym pierwiastki Ti, Nb i Zr. Pokrywająca fazę β wzbogacona w niob warstwa tlenkowa stopu Ti6Al7Nb jest bardziej stabilna w porównaniu z bogatą w glin warstwą tlenkową ponad fazą α. Wyższą odporność korozyjną warstwy tlenkowej stopu Ti6Al7Nb przypisuje się obniżeniu stężenia defektów. Formowany anodowo tlenek TiO₂ jest półprzewodnikiem typu n, co oznacza, że dysponuje wakansami tlenowymi i nadmiarem jonów tytanu Ti3+. Dodatek do tytanu metalu o wyższej wartościowości, takiego jak niob, powoduje korzystny efekt polegający na pochłanianiu wakansów anionowych i zmniejszeniu ilości defektów warstwy anodowej [1].

Wnioski

Dwa badane stopy tytanu wykazują różnice zarówno w przebiegu anodowania, jak i we właściwościach otrzymanych warstw anodowych. Różnice te wynikają nie tylko z natury chemicznej analizowanych pierwiastków stopowych: V i Nb, ale także z ich wzajemnego oddziaływania z czynnikiem utleniającym jakim jest 2M H₃PO₄.

Piśmiennictwo

- E. Krasicka-Cydzik, Formowanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego implantowych stopach w środowisku kwasu fosforowego. Monografia. UZ, Zielona Góra 2003
- [2] X.Liu, P.K.Chu, Ch.Ding. Materials Science and Engineering R.47 (2004) 49–121

[3] ISO 5832-3. Implants for surgery: Wrought titanium-6 aluminium-4 vanadium alloy. ASTM F-136 – Specification for Titanium 6AI-4V ELI for Surgical Implant Applications.

[4] TIMET Ltd, UK, http://www.timet.com

[5] ISO 5832-11. Implants for surgery: Wrought titanium 6-aluminium 7-niobium alloy. ASTM F-1295 – Specification for Titanium 6AI-7Nb for Surgical Implant Applications. two sub-layer structure of surface layer on anodised materials, consisting of compact oxides at the boundary with metal and adsorbed phosphates at the boundary contacting with electrolyte [1,11].

Graph E-pH for Al–P– H_2O system presented in FIG.3 prepared according to [10], confirms the possibility of thermodynamically stable AlPO₄ to exist in the conditions of anodising.



RYS.3. Wykres E–pH dla układu dla AI-P-H₂O, opracowany według oprogramowania HSC [10]. FIG.3. E–pH diagram for AI-P-H₂O system, prepared according to [10].

A stronger response of tissue in a contact with the surface Ti6Al4V "in vitro" [12] also confirms its higher susceptibility to corrosion in comparison with Ti6AI7Nb alloy. Replacement of V by Nb in titanium implant alloys increases alloy resistance for dissolution in acids and improves passivity of Ti. It is due to introduction of Nb element and enrichment of oxide layer of Ti in Nb2O5 oxide in result of preferential dissolution of Ti. The influence of Nb additions is favourable because it forms stronger covalent bonds of orbital d electrons with elements Ti, Nb and Zr - neighbouring in periodic table [13]. High corrosion resistance of oxide layer of Ti6Al7Nb alloy is attributed to lower defect concentration in TiO₂ layer. Anodic TiO₂ oxide is n type semiconductor with oxide vacancies and an excess of titanium Ti3+ ions. Addition of niobium to titanium, causes favourable effect of anion vacancies absorption and decreasing the number of defects [1].

Conclusions

Two investigated titanium alloys with the same amount of AI, differ significantly in the course of anodising and the properties of the obtained anodic layers. The differences result not only from the chemical nature of alloying elements V i Nb, but also from the mutual reactions between them and the oxidizing agent: $2M H_3PO_4$.

References

[6] P. Marcus. Surface science approach of corrosion phenomena. Electr Acta, 43, 1-2 (1998) 109

[7] H. Bala, Korozja materiałów, Teoria i Praktyka, Czestochowa 2002.
[8] I. Metikosz, A. Kwokal, J. Piljac, Biomaterials, 24, 21 (2003) 3765.
[9] I. Privman, T. Hepel, J Electroanal Chem. 382 (1995) 137–44.
[10] A.Roine, HSC Chemistry Software, Version 2.03, Outkumpu Research Oy, Pori, Finland 1994

[11] E. Krasicka-Cydzik, Corrosion Science 46 (2004) 2487-2502.
[12] A. Kierzkowska, E. Krasicka-Cydzik, this jounal, in press.
[13] M.I.Suleiman, R.C. Newman, Corrosion Science 36, 9 (1994), 1657.

32

ANALIZA NUMERYCZNA PŁYT DO LECZENIA LEJKOWATEJ KLATKI PIERSIOWEJ

A. KRAUZE, J. MARCINIAK

Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Wydział Mechaniczny Technologiczny, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice, E-mail: anita.krauze@polsl.pl

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 32-34]

Wprowadzenie

W 1998 roku Donald Nuss przedstawił nową, minimalnie inwazyjną technikę operacji lejkowatej klatki piersiowej. Niewątpliwymi zaletami tej metody są: krótki czas hospitalizacji oraz bardzo dobry wynik kosmetyczny. Technikę wprowadzania płyty przedstawia – RYS.1.

NUMERICAL ANALYSIS OF PLATES USED IN FUNNEL CHEST TREATMENT

A. KRAUZE, J. MARCINIAK

Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Wydział Mechaniczny Technologiczny, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 18a, 44-100 Gliwice, E-mail: anita.krauze@polsl.pl

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 32-34]

Introduction

In 1998 Donald Nuss introduced a new, minimally invasive technique of funnel chest treatment. Short hospitalization time and good temporary cosmetic result are doubtless advantages of this method. Implantation technique is presented in FIGURE 1.



RYS.1. Technika wprowadzenia płyty stabilizującej w metodzie Nuss'a: a) wykonanie otworów, b) przeciągnięcie taśmy kierunkowej, c) wprowadzenie odpowiednio domodelowanej płyty, d) odwrócenie płyty o 180° i korekcja deformacji [1,2].

FIG.1. Implantation technique of fixation plate - Nuss method: a) drilling the holes, b) insertation of clamb, c) insertation of bent plate, d) reversion of the plate (180°) and correction of deformation [1,2].

W metodzie Nussa kości nie są resekowane, ani przecinane. Korekcja zniekształcenia następuje wskutek wzrostu żeber według ukierunkowanej płytą stabilizującą formy. Dotyczy to zwłaszcza dzieci małych, co rozszerza wskazania do operacji w okresie wczesnodziecięcym od 3 do 8 roku życia. U chorych w starszym wieku można uzyskać lepszy wynik kosmetyczny, jednakże późny wiek chorych łączy się z dużymi trudnościami w odkształceniu zdeformowanej przedniej ściany klatki piersiowej, w której części chrzęstne są już częściowo utwardzone.

Metodyka

Do analizy numerycznej wytypowano płyty o własnościach mechanicznych stali Cr-Ni-Mo (AISI 316LVM) zgodnych z zaleceniami normy PN ISO 5832-1 oraz stopu tytanu Ti-6AI-4V ELI o własnościach zawartych w normie ISO 5832-3 [3÷6]. W pierwszym etapie badań przygotowano modele geometryczne płyt. Wytypowano 2 płyty o grubości g=2,5 i 3,5mm oraz długościach I: 160 i 200mm.

W kolejnym etapie na bazie wykonanych modeli geometrycznych wygenerowano siatkę elementów skończonych do obliczeń MES. Dyskretyzację przeprowadzono za pomocą elementu typu SOLID45. In this method bones are not resected or intersected. Correction of deformation is realized by the growth of ribs along the fixation plate. It concerns especially small children (3-8 year). For adults the better cosmetic result can be obtained but there are serious difficulties in deformation of chest (costochondral hardening).

Methods

The researches were performed on plates made of the Cr-Ni-Mo stainless steel (AISI 316LVM) of the highest purity, that meet all the requirements enclosed in PN ISO 5832-1 standard and Ti-6AI-4V ELI alloy [3-6].

The first part of the work was the creation of physical models of the stabilizing plate. The analyses were performed for 2 kind of plates: thickness g=2,5 and 3,5 mm, length I=160 and 200mm.

On the basis of the geometrical models a finite element mesh was generated. The meshing was realized with the use of the SOLID45 element. Po dyskretyzacji modelu ustalono następujące warunki brzegowe :

 * zewnętrzna część płyty została obciążona siłą pochodzącą od ugięcia klatki piersiowej - F,

 * stopnie swobody zostały odebrane adekwatnie do obiektu rzeczywistego (w obszarze występowania otworów),

 * płyta była obciążana siłami, które nie powodowały przekroczenia granicy plastyczności, odpowiednio dla stali Cr-Ni-Mo - R_{p0,2min}=690 MPa oraz stopu tytanu Ti-6AI-4V ELI - R_{p0,2min}=895 MPa,

Dla potrzeb analizy rozpatrywanych płyt dobrano następujące własności mechaniczne:

- dla stali Cr-Ni-Mo [7]:

* moduł Younga E=200000 MPa, współczynnik Poissona v= 0,33,

- dla stopu Ti-Al-4V ELI [8]:

* moduł Younga E=110000 MPa, współczynnik Poissona v= 0,33.

Wszystkie obliczenia przeprowadzono metodą elementów skończonych w programie Ansys 10.

Wyniki

Przemieszczenia, odkształcenia i naprężenia uzyskane w wyniku analizy numerycznej są wartościami zredukowanymi według hipotezy Hubera-Misesa-Henck'ego. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabelarycznej – TABELA 1 oraz w formie graficznej – FIG.2.

Zaznaczyły się różnice w wartościach przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych w zależności od grubości i długości analizowanych płyt oraz zastosowanego biomateriału metalowego. After discretisation the following boundary conditions were set:

* the outer plane of the plate was loaded with the force directed inward – the sternum reaction - F,

* the degrees of freedom were taken away in the way reflecting the displacement of the real object,

* the plate was loaded with the maximum force which didn't cause the exceeding of the metallic biomaterial yield stress (Cr-Ni-Mo - $R_{\rm p0,2min}$ =690 MPa and Ti-6AI-4V ELI - $R_{\rm p0,2min}$ =895 MPa),

The following material properties were set:

o stainless steel Cr-Ni-Mo [7]:

* Young modulus E=200000 MPa, Poisson's ratio v= 0,33,

o titanium alloy - Ti-Al-4V ELI [8]:

* Young modulus E=110000 MPa, Poisson's ratio v= 0,33.

All calculations were performed with the use of the finite element method in the ANSYS 10 program.

Results

The obtained displacements, strains and stresses are the reduced values according to the Huber-Mises-Henck hypothesis. The obtained results were presented in table as well as in the graphic form – TABLE 1, FIG.2.

The differences in displacements, strains and reduced stresses depending on the thickness and the length of the analyzed plates and the applied biomaterial were observed.

Biomat.	g [mm]	l [mm]	F [N]	Przem. / Displ. [mm]	Odkszt./ Strain [%]	Napr. / Stress [MPa]	g [mm]	ا [mm]	F [N]	Przem. / Displ. [mm]	Odkszt. / Strain [%]	Napr. / Stress [MPa]
Stal		160	640	1,52	3	688		160	1040	1,15	4	685
Cr-Ni-Mo	2.5	200	430	2,55	3	690	3.5	200	795	2,04	3	689
Ti-6Al-4V	2,5	160	825	3,56	8	887	5,5	160	1350	0,27	0.9	889
ELI		200	555	5,99	8	891		200	1020	0,47	0.8	884
a - arubość	a - grubość płyty I - długość płyty E - siła docisku Przem - przemieszczenie Odkszt - odkształcenie Napr – napreżenie											

g - grubosc pryty, 1 - drugosc pryty, F - sira docisku, Przem. - przemieszczenie, Odkszt. - odkształcenie, Napr. – naprężenie Biomat.- metallic biomaterials, g - thickness, I - length, F - the sternum reaction, Displ. - displacement

TABELA 1. Maksymalne obciążenie płyty w zależności od biomateriału metalowego, jego grubości i długości. TABLE 1. The maximum forces affecting the plate depending on its thickness and metallic biomaterial.

Podsumowanie

Analizę numeryczną przeprowadzono w celu wyznaczenia stanu przemieszczeń, odkształceń i naprężeń płyt do leczenia lejkowatej klatki piersiowej. Wyniki, które otrzymano są istotne dla doboru struktury i własności mechanicznych biomateriałów metalowych przeznaczonych na płyty stabilizacyjne. Na podstawie przyjętych warunków brzegowych adekwatnych do stosowanych w warunkach klinicznych oraz uzyskanych przemieszczeń, odkształceń i naprężeń zredukowanych można stwierdzić, że:

 * maksymalne naprężenia występujące w płytach nie przekraczają wartości granicy plastyczności dla stali Cr-Ni-Mo - R_{p0,2min}=690 MPa oraz stopu tytanu Ti-6AI-4V - R_{p0,2min}=895 MPa,

* dla tak dobranych sił obciążających minimalną wartość przemieszczenia uzyskano dla płyty o własnościach stopu tytanu o długości I=160mm i grubości g=3,5mm (siła docisku F=1350 N),

Conclusions

In order to calculate in displacements, strains and stresses of plates used in treatment of funnel chest the numerical analysis was applied. The obtained results are the basis for selection of the structure and mechanical properties of the metallic biomaterials intended for stabilization plates.

On the basis of the performed displacement, strain and stresses analyses of the stabilizing plate it can be stated that:

* maximum displacement, strain and stresses occurring in the plate can not exceed $R_{p_{0,2min}}$ =690 MPa (stainless steel) and $R_{p_{0,2min}}$ =895 MPa (titanium alloy) which are equal to the force affecting the plate in the place where it sticks to the sternum,

* the minimum displacement was observed for the titanium-alloy plate of length I=160 mm and thickness g=3,5mm (loading force F=1350 N),



RYS.2. Płyta ze stali Cr-Ni-Mo (I=160mm i g=2,5mm): a – przemieszczenia zredukowane, b – odkształcenia zredukowane, c – naprężenia zredukowane.

FIG.2. The plate made of stainless steel Cr-Ni-Mo (I=160mm and g=2,5mm): a) displacements distribution, b) strain distribution, c) stress distribution.

 * ogólnie mniejsze wartości przemieszczeń występują w płytach o grubości g=3,5mm, zarówno dla przyjętych własności stali jak i stopu tytanu,

* cechy geometryczne oraz własności mechaniczne analizowanych płyt warunkują możliwość ich odkształcania w trakcie użytkowania w zakresie sprężystym. To stanowi podstawy kryterium ich klinicznego zastosowania. * generally, lower displacement values are observed for the plates of the thickness of g=3,5mm, both for the stainless steel and the titanium alloy,

* geometrical features and mechanical properties of the analyzed plates enable elastic strains during loading. It determines the basic criterion of clinical application.

Piśmiennictwo

[1] Nuss D., Kelly R.E., Croitoru P., Katz M.E.: A 10-year of minimally invasive technique for the correction of pectus excavatum. Journal of Pediatric Surgery, 1998, 33(4), pp. 545-552.

[2] Y. Watanabe, T. Iwa: Surgical Correction of pectus excavatum for Adults and Adolescents. Japanese Journal of Surgery, Vol 14, No 6, 1984, pp 472-478.

[3] A. Krauze, J. Marciniak, J. Dzielicki, Corrosion resistance of plate used in pectus excavatum treatment, XVI Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine. October 12th – 15th (2006), Rytro, Engineering of biomaterials, No 58-60, 149-152.

[4] A. Krauze, W. Kajzer, J. Dzielicki, J. Marciniak, Influence of mechanical damage on corrosion resistance of plates used in funnel chest treatment, Journal of Medical Informatics & Technologies, Vol. 10, December (2006), 133-141.

References

[5] A. Krauze, W. Kajzer, J. Dzielicki, Evaluation of surface damage of plates used in funnel chest treatment, XI International Conference, Medical Informatics & Technologies, September 25-27, (2006), Wisla, 289-295

[6] A. Krauze, W. Kajzer, W. Walke, J. Dzielicki, Physicochemical properties of fixation plates used in funnel chest treatment, Journal of Achievements in Material and Manufacturing Engineering, Vol 18, Issue 1-2, September October (2006), 151-154.

[7] Norma: ISO 5832-1, Implants for surgery metallic materials, Part I: Wrought stainless steel, (1997).

[8] Norma: ISO 5832-3.

BI MATERIALS

MECHANICZNE I FIZYKO-CHEMICZNE WŁAŚCIWOŚCI WARSTW TiO₂

Justyna Krzak-Roś¹, Dominika Grygier¹, Agnieszka Baszczuk¹, Romuald Będziński²

¹ Instytut Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej, Politechnika Wrocławska, Polska ² Instytut Konstrukcji i Eksploatacji Maszyn, Politechnika Wrocławska, Polska

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 35-37]

Wprowadzenie

Technika zol-żel jest pomyślnie stosowana do produkcji różnorodnych materiałów. W syntezie zol-żel używa się kompleksów alkoholanowych jako prekursorów. Obserwuje się formowanie się sieci tlen-metal dzięki równoczesnej hydrolizie i polikondensacji. W wyniku reakcji otrzymujemy materiały o różnorodnych kształtach: warstwy [1], bloczki [2], proszki [3].

Naukowcy badają możliwości stosowania warstw ochronnych jako powłoki na implanty ortopedyczne, stosując cienkie filmy (pojedyncze warstwy) [4] lub powłoki wielowarstwowe [5]. Takie powłoki powinny charakteryzować się dużą twardością, wytrzymałością mechaniczną, biokompatybilnością oraz silną adhezją do podłoża [6].

Badacze rozważają zastosowanie warstw otrzymywanych metodą zol-żel jako powłoki na materiały implantacyjne [1,2,7,8].

Ditlenek tytanu jest stabilny termodynamicznie, obojętny chemicznie, charakteryzuje się biokompatybilnością oraz odpornością korozyjną [9,10]. Powszechnie wiadomym jest, że TiO₂ zmniejsza ryzyko odrzucenia implantu przez żywy organizm. Jednym z podstawowych zadań warstw powierzchniowych jest ochrona przed korozją wywołaną agresywnym środowiskiem jakim jest żywy organizm. Ochrona taka możliwa jest dzięki redukcji dyfuzji (przez zastosowanie warstwy powierzchniowej) do materiału implantacyjnego [11,12]. Innym ważnym zadaniem powłok jest zmniejszenie przedostawania się jonów metali (pochodzących z implantu) do organizmu. Zapobieganie zjawisku metalozy. Kolejnym problemem jest trwałe i zmienne obciążenie implantów biodrowych. TiO₂ występuje w trzech różnych formach krystalicznych: anataz, brukit i rutyl. Jedynie anataz i rutyl są formami stabilnymi [13]. Badano interakcje pomiędzy stabilnymi formami TiO₂ a SBF (Simulated Body Fluid). Wyjaśniono, że kiedy anataz przechodzi w rutyl rozpuszczalność jonów metali w SBF znacząco spada.

W opisywanym eksperymencie badano pierwszą formę krystaliczną TiO_2 – anataz. Spowodowane to było faktem, że jako podłoży używano stali nierdzewnej 316L. Powłoki na podłożach wygrzewano w temp. 500°C, otrzymano anataz.

Materiały i metody

Nieorganiczne cienkie filmy syntezowano za pomocą metody zol-żel. Jako substratów użyto Ti(i-PrO)₄ (TIPO), propanolu oraz acetyloacetonu (AcAc) jako stabilizatora. Substraty mieszano na mieszadle magnetycznym w temp. pokojowej. Niewielką część zolu pozostawiono do wyschnięcia. Otrzymany proszek użyto do pomiarów właściwości fizykochemicznych otrzymanych powłok. Zol użyto do nakładania warstwy, na podłoża ze stali 316L, metoda dip-

MECHANICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF TITANIUM DIOXIDE THIN FILMS

Justyna Krzak-Roś¹, Dominika Grygier¹, Agnieszka Baszczuk¹, Romuald Będziński²

¹ INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND APPLIED MECHANICS, WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND ² INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION, WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 35-37]

Introduction

The sol-gel technique is successfully used to produce commonly applied materials. Precursor used in sol-gel synthesis are metal-alkoxides. The material growth in the sol proceeds over hydrolysis, condensation and aggregation. The sol-gel method is using to obtain various final forms of gel: films [1], monoliths [2], powders [3].

Various researchers have studied the application of protective coatings to orthopedic implants, applying a thin film [4] or multilayers [5]. The coating should preferably have a high hardness value and resistance to mechanical wear, as well as biocompatibility and good adhesion to the substrate on witch they are deposited [6]. Researchers consider the possibility of using sol-gel thin layers as medical implants' coatings [1,2,7,8].

Titanium dioxide is thermodynamically stable, chemically inert and has a biocompatibility and corrosion resistance properties [9,10]. Besides it is commonly known that titanium oxide decreases the risk of implants rejection by living organisms. The basic role of superficial layers, because of reducing diffusion to implant base material (metal alloys), is to protect implant from corrosion caused by aggressive environment of living organism [11,12]. Second task is to decrease the diffusion of specific metal ions from implant into an organism what prevent metalosis. Specification of hip implants working conditions is that they are exposed on permanent and changing load. This is the reason to proceed mechanical examination of mentioned films. TiO₂ occurs as three different crystal forms: anatase, brookite and rutile. However, only the anatase and rutile are stabile [13]. Wisbey et al. [13] investigated interaction between stable crystal forms of TiO₂ and SBF (Simulated Body Fluid). They found that after anatase to rutile phase transmition, metallic ions solubility in SBF decreased significantly. In current research Authors used 316L stainless steel as the backgrounds. And for this reason the temp. of heating was limited to 500°C. In this temp. the anatase crystal form is obtained.

Materials and methods

.

Inorganic thin films were synthesized by sol-gel method. Titania films were prepared by mixing, on a magnetic stirrer, Ti (i-PrO)₄ (TIPO), isopropanol and acetyloacetone (AcAc), at room temperature. AcAc was used as the stabilizator. The part of the sol was allowed to dry. Arise powder was used to measure physicochemical properties. The main part of sol was used for dip-coating. Three layers were deposited for backgrounds. The samples (backgrounds with coatings) were dried and heated at 500°C.

The physicochemical properties of the obtaining materials were characterized using the infra-red spectroscopy. The adhesion tests of the coatings were carried out using coating. Na każde podłoże warstwę nakładano trójkrotnie.Próbki suszono w temperaturze 500°C.

Właściwości fizykochemiczne, otrzymanych materiałów, mierzono za pomocą spektroskopii w podczerwieni. Adhezja warstw do podłoża mierzona była za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego (SEM). Zmierzono również chropowatość, otrzymanych powłok, za pomocą profilografometru. Przeprowadzono próbę rozciągania próbek (podłoże + warstwa), dla których wcześniejsze badania na skaningowym mikroskopie elektronowym wykazały bardzo dobrą adhezję powłoki do podłoża (podłoże – stal 316L).

Wyniki badań

Spektroskopia IR posłużyła do określenia właściwości fizykochemicznych otrzymanych materiałów. Wyniki przedstawiono poniżej.



RYS.1. Widmo IR TiO₂. FIG.1. IR spectrum of TiO₂ powders.

Liczba falowa / The wave number [cm ⁻¹]	Rodzaj drgania / The kind of oscillation
1600,3208	Ti-OH, rozciągające / stretching
500-800	Ti-O-Ti, rozciągające / stretching
450-575	Ti-O, max 534 cm ⁻¹ (anataz / anatase)
450-750	Ti-O, max 521 i 674 cm ⁻¹ (rutyl / rutile)
3300	v(OH)
1630	δ(HOH), zginające / bending
721;1370-1380;1450-1465;2800-2950	nujol

TABLE 1.Charakterystyka drgań (TiO₂). TABLE 1. Characteristic of IR spectrum (TiO₂).

Badania za pomocą spektroskopii IR prowadzono na trzech proszkach TiO₂ różniących się temperaturą wygrzewania. Wyniki z pomiaru absorpcji promieniowania podczerwonego dowodzą, że spodziewane zanikanie pasm od grup organicznych nastąpiło w temp. ok. 500°C.

Analiza mikroskopowa morfologii powierzchni (RYS.2,3) warstw TiO₂ wykazała, że otrzymane powłoki wykazują się dobrą adhezją do podłoża.

Na zdjęciach nie obserwuje się pęknięć, a powłoka jest ciągła na całej badanej powierzchni. Takie wyniki wskazują na silne oddziaływania występujące pomiędzy powłoką, a podłożem. the Scanning Electron Microscope (SEM). The roughness was measured using profile measurement gauge. The initial stretching tests for samples (backgrounds + coatings) were conducted. For this samples the previous SEM measurements showed good coatings adhesion.

Results

The infra-red spectroscopy was used to characterize physicochemical properties of obtained thin films. The results were shown below (FIG.1, TAB.1).

The results of the infrared absorption measurements carried out on the variously heat treated gels showed the expected reduction in the absorption peaks due to residual organic groups, as the heat treatment temperature was increased. The results show that above 500°C organic group are completely eliminated and absorption bands from organic groups disappear from the spectra of TiO₂ samples.

The microscopic morphology of TiO_2 thin films deposited on stainless steel and heated at 500°C are shown in FIG.2,3. The obtained SEM micrographs confirm that the employed coating method yields films with good adhesion to the substrate surface. These coatings are continuous on all surface which may provides good corrosion resistant properties. Such results can indicate that intermolecular interaction between surface of background and coating are very strong. Further investigation will display what kind of interactions they are.



RYS.2. Zdjęcie z SEM – czyste podłoże stal 316L. FIG.2. SEM micrographs of backgrounds.



FIG.3. Zdjęcie z SEM – powłoka TiO₂ na 316L. FIG.3. SEM micrographs of TiO₂ coating on 316L stainless steel 316L plates.



FIG.4.Chropowatość podłoża-316L plates. FIG.4.The roughness of background - 316L plates.

Analiza badań chropowatości (RYS.4,5) wykazuje, że to podłoże ma znaczący wpływ na chropowatość próbki.



FIG.5. Chropowatość próbki (warstwa TiO₂ na podłożu 316L). FIG.5. The roughness of sample (TiO₂ coating on background).

The roughness analysis results show (FIG.4,5) that the backgrounds have significant influence on the results of the roughness measurements.

Próbka / Sample	R _a [µm]	R _q [μm]	R _z [µm]		
Podłoże / Background	0.040	0.057	0.530		
TiO₂ on 316L	0.067	0.087	0.550		
R _a -średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości / R _a -average arithmetical roughness R _q -średnie kwadratowe odchylenie profilu chropowatości / R _q -average square roughness					

TABELA 2. Parametry geometryczne próbki. TABLE 2. The geometrical parameters of samples.

Podsumowanie

Otrzymano warstwy TiO₂ (powłoki) bez grup organicznych oraz wody. Powłoki są ciągłe na całej badanej powierzchni. Parametry chropowatości mogą być modyfikowane przez parametry podłoża. Jest to spowodowane, tym że powłoka nanoszona jest w fazie ciekłej, co pozwala na odwzorowanie powierzchni podłoża. Badania mikroskopowe próbek przed i po próbie rozciągania wykazały brak wpływu odkształceń podłoża na adhezję omawianych powłok. Nie zaobserwowano wad w postaci pęknięć lub wyłuszczeń, a przerwanie nastąpiło jedynie w miejscu przerwania podłoża.

Uzyskane wyniki badań oraz analiza literatury wykazały, że otrzymane metodą zol-żel powłoki TiO₂ mogą stanowić dobrą barierę pomiędzy materiałem metalicznym implantu a organizmem żywym. Otrzymany TiO₂ nie stanowi zagrożenia dla żywych tkanek.

Summary

The TiO_2 thin films (coatings), free from organic groups and water have been obtained. The coatings are continuous, without cracks and splinters. Due to the fact that the coatings are applied form liquid phase, the roughness parameters can be modified by selection of backgrounds with required roughness. SEM measurements before and after initial stretching tests demonstrate that they have no influence on coating adhesion.

All received data and literature analysis allows us to assume that obtained sol-gel coatings set up a good barrier between organism and implant's material and obtained TiO_2 is not destructive for living organism.

Piśmiennictwo

[1] Viitala R., Jokinen M., Peltola T., Gunnelius K., Rosenholm J.B., Biomaterials 23 (2002) 3073-3086.

[2] Pereira M., Clark A.E., Hench L.L., J. Am. Ceram. Soc. 78 (1995) 2463-2468

[3] Brinker C.J., Scherer G.W., Sol-Gel Science, Academic Press, Inc., San Diego 1990.

- [4] Günzel R., Mändl S., Richter E., Liu A., Tang B.Y., Chu P.K., Surf. Coat. Technol. 116/119 (1999) 1107.
- [5] Hübler R., Surf. Coat. Technol. 116/119 (1999) 1116.
- [6] Hübler R., Cozza A., Marcondes T.L., Souza R.B., Fiori F.F.,
- Surf. Coat. Technol. 142/144 (2001) 1083.

[7] Będziński R., Krzak-Roś J., Stefańska M., Maruszewski K. Strain in press.

References

[8] Sakka S., Yoko T., J. Non-Cryst. Solids 147/148 (1992) 394-403.
[9] Branemark P. Scand J Plast Reconstr Surg 1977;11:39.
[10] Ask M, Lausmaa J, Kasemo B. Appl Surf Sci 1988/89;35:283, 301.
[11] Falset M., Mahdjoub H., Gautier B., Bauer J.P., J. Non-Cryst. Solids (2001) 293-295.

[12] Nonami T., Taoda H., Hue N.T., Watanabe E., Iseda K., Tazawa M., Mater. Res. Bull. (1998), 33(1).

[13] A. Wisbey, et al., Biomaterials 12 (1991) 410-412.

SUPERSPRĘŻYSTE IMPLANTY NiTi DLA CIĄGŁEJ DYSTRAKCJI KOŚCI

Z. LEKSTON, D. STRÓŻ, H. MORAWIEC

INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, UNIWERSYTET ŚLĄSKI, 40-007 KATOWICE, BANKOWA 12 E-MAIL: ZLEKSTON@US.EDU.PL

Streszczenie

Zasadniczym założeniem tej pracy było osiągnięcie nadspreżystości implantów użytych do dystrakcji kości dla korekcii deformacii czaszkowo-twarzowych. Opisano dwie możliwości przygotowania nadsprężystych, sprężynowych implantów użytych w kranioplastyce. W pierwszej użyto nadsprężyste, proste druty jako sprężyny w kształcie Ω lub U. Nadsprężystość jest indukowana w drutach przez wstępną deformację na zimno i wyżarzanie poniżej temperatury rekrystalizacji. Struktura dyslokacyjna i mało-kątowe granice ziaren są charakterystyczne dla struktury tych drutów. Druga możliwość indukowania nadsprężystości w sprężynach pierścieniowych bazuje na umocnieniu wydzieleniowym. W tym celu użyto stop z wyższą zawartością niklu (51%at.) w którym wydzielanie koherentnych cząstek fazy Ni₄Ti₃ prowadzi do umocnienia osnowy i pozwala osiągnać wyraźne plateau naprężania na krzywej naprężenie-odkształcenie. Przydatność uzyskanych implantów wykazano w zastosowaniach klinicznych. Słowa kluczowe: stopy NiTi, nadsprężyste implanty, ciągła dystrakcja kości, sprężyny dla kranioplastyki.

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 38-42]

Wstęp

Stopy NiTi stały się ważnym materiałem, który umożliwia przezwyciężenie szerokiego zakresu technicznych i projektowych problemów związanych z miniaturyzacją urządzeń medycznych i oferuje mniej inwazyjne, a zatem mniej urazowe procedury medyczne [1]. Pamięć kształtu i nadspreżystość sa cennym rozwiazaniem dla problemów w przemyśle urządzeń medycznych. Ostatnie osiągniecia w medycznych zastosowaniach ukazują szybki rozwój w tej dziedzinie [2,3]. Dystrakcyjna osteogeneza jest procesem rozciągania kości do uzyskania jej wydłużenia przez generowanie wzrostu nowej tkanki kostnej. Ten proces jest używany dla dystrakcji wadliwej kości [4]. Jak dobrze wiadomo, stalowe sprężyny podczas ich rozciągania tracą swą siłę. Z tego względu zastosowanie w chirurgii czaszkowo-twarzowej nadsprężystych sprężyn NiTi wykazujących plateau siły w długo-czasowej dystrakcji może przynieść dużo lepszy skutek [5-7].

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na dwóch komercyjnych stopach NiTi o zawartości niklu 50,6 i 51,0 %at. w kształcie prostych drutów. Analizę chemiczną wykonano metodą spektroskopii dyspersji energii (EDS) na skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) JEM-6480. Proces wydzieleniowy badano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) przy użyciu mikroskopu JEM 3010.

SUPERELASTIC NITI IMPLANTS FOR CONTINUOUS BONE DISTRACTION

Z. LEKSTON, D. STRÓŻ , H. MORAWIEC

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE, UNIVERSITY OF SILESIA, 40-007 KATOWICE, BANKOWA 12 E-MAIL: ZLEKSTON@US.EDU.PL

Summary

The basic assumption of this work was to achieve the superelastic behaviour of implants used for bone distraction for correction craniomaxillofacial deformities. This paper describes two possibilities of preparing the superelastic spring implants used in cranioplasty. In the first one the superelastic straight wires were used for Ω or U-shape springs. The superelasticity is induced to the wires by a proper cold deformation and annealing below the recrystallization temperature. Dislocation cells and low angle grain boundaries are characteristic for the structure of these wires. The second possibility of the superelasticity induction into ring springs is based on the precipitation hardening. For this purpose an alloy with higher amount of nickel (51 at.%) was used at which precipitation of the Ni₄Ti₃ coherent particles leads to the matrix hardening and allows to achieve a distinguish stress plateau on the stress-strain curve. The obtained implants have shown their usefulness in clinical applications.

Keywords: NiTi alloys, superelastic implants, continuous bone distraction , springs for cranioplasty.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 38-42]

Introduction

NiTi alloys have become an important material, which allows us to overcome a wide range of technical and design issues relating the miniaturisation of medical devices and offers less invasive, and therefore less traumatic medical procedures [1].

Shape memory and superelasticity are valuable solutions for problems in the medical device industry. Recent achievements in medical applications show fast development in this field [2,3]. Distraction osteogenesis is a process of stretching the bone to obtain its lengthening by generation a growth of a new bone tissue. This process is used for distraction of a deficient bone [4]. As it is well known, steel springs during their expanding loose their force. For this reason application of superelastic NiTi springs with their force plateau for the continuous bone distraction in craniofacial surgery will give much better effect [5-7].

Materials and methods

The studies were carried out on two commercial NiTi alloys (with 50.6 and 51.0 at.% Ni content) in the form of straight wires. The chemical analysis was carried out using the energy dispersive spectroscopy (EDS) method in a scanning electron microscope (SEM) JEM-6480. The precipitation process was controlled by the transmission electron microscopy (TEM) method using the JEM 3010 instrument.

Wyniki i dyskusja

Indukowanie nadsprężystości przez deformację i wyżarzanie

Właściwy dobór stopnia deformacji i temperatury wyżarzania umożliwia regulowanie temperatur charakterystycznych przemiany martenzytycznej i umocnienie stopów. Wpływ temperatury wyżarzania na temperatury przemian M_s and T_R pokazano na RYS.1. Możliwość kontrolowania mechanicznych własności stopu przez deformacje i wyżarzanie pokazano na RYS.2. Porównanie krzywych umocnienia dla próbki szybko chłodzonej z temperatury 800°C z krzywymi próbek deformowanych 10% odkształceniem i wyżarzanych w czasie 1 godziny w temperaturach 673 i 773K pokazuje możliwość kontrolowania własności mechanicznych stopów NiTi.



RYS.1. Zmiany Ms i TR w zależności od temperatury wyżarzania deformowanej próbki. FIG.1. Change of Ms and TR as a function of annealing temperature for a deformed specimen.

Mikrostrukturę walcowanych taśm z 30% deformacją pokazano na RYS.3. Deformacja powoduje indukowanie niewielkiej ilości martenzytu. Wyżarzanie deformowanego stopu poniżej temperatury rekrystalizacji prowadzi do formowania wydłużonych subziarn z małokątowymi granicami, typowymi dla procesu zdrowienia. RYS.4 pokazuje mikrostrukturę, konieczną dla uzyskania nadsprężystości badanych stopów.



RYS.3. Mikrostruktura deformowanego stopu Ti–50,6%at.Ni z małą ilością martenzytu. FIG.3. Microstructure with small amount martensite of deformed Ti- 50.6 at.% Ni alloy.

Results and discussion

Superelasticity induced by deformation and annealing

A proper choice of the deformation degree and the annealing temperature allows us to control the characteristic temperatures of the martensitic transformation and the hardening of the alloys. The effect of the annealing temperature on the M_s and T_R transformation temperatures is shown in FIG.1. The possibility of controlling the alloy mechanical properties by deformation and annealing is shown in FIG.2. The comparison of the hardening curves for the quenched from 800°C sample with the deformed by 10% strain and annealed for 1 hour at 673 and 773K gives the tool to control the mechanical properties of the NiTi alloys.



RYS.2. Krzywe umocnienia stopu Ti-50.6at.%Ni po obróbce termomechanicznej. FIG.2. Hardening curves for different thermomechanical treatment of alloy Ti- 50.6at.% Ni.

The microstructure of the deformed by 30% rolling strips is shown in FIG.3. The deformation induces small amount of martensite into the microstructure, which is confirmed by the attached electron diffraction pattern. The low temperature annealing of the deformed alloy below the recrystallization temperature leads to formation of elongated subgrains with low-angle boundaries typical for the recovery process. FIG.4 shows the microstructure that is preferred to obtain the superelastic behaviour of the studied alloys.



RYS.4. Mikrostruktura stopu Ti–50,6%at.Ni po 30% deformacji i wyżarzaniu w temperaturze 450°C w czasie 30 minut. FIG.4. Microstructure of Ti-50.6 at.%Ni alloy defor-

FIG.4. Microstructure of 11-50.6 at.%Ni alloy deformed by 30% and annealed at 450°C/30'.



RYS.5. Krzywa naprężenie-odkształcenie podczas naprężania i odciążania stopu Ti-50.6at.%Ni po 30% deformacji i wyżarzaniu w temperaturze 450°C w czasie 30 minut. FIG.5. Stress- strain curves for loading and

unloading for alloy Ti-50.6at.% Ni deformed by 30% and annealed at 450°C for 30 minutes.

Plateau nadsprężystości próbki z 30% deformacją wyżarzanej w temperaturze 450°C przez 30 minut pokazano na RYS.5. Nadsprężyste implanty do dystrakcji kości były formowane jako proste druty ze stopów nadsprężystych. Implanty działające jako rozciągające sprężyny, mocowane w kształcie łuków na zdekortykowanej kości, pokazano schematycznie na RYS.6.

Indukowanie nadsprężystości dystraktorów pierścieniowych przez umocnienie wydzieleniowe

Korekcja czaszki w długo-czasowej dystrakcji może być osiągnięta przy użyciu sprężyn w kształcie pierścieni. Spłaszczony pierścień w kształcie elipsy implantowany pod skórę, przymocowany na czaszce, wywierający siły w pożądanych kierunkach pokazano schematycznie na RYS.7.



RYS.7. Schematyczne przedstawienie sił wywieranych na czaszkę przez spłaszczony pierścień. FIG.7. Sketch of forces exerted on the skull in a flattened ring.

Pierścienie formowano z prostych nadsprężystych drutów spawanych wiązką laserową. W pierścieniach wykonanych ze stopu o zawartości 51,0%at. Ni, nadsprężystość indukowano poprzez starzenie pod naprężeniem. Sprężyste charakterystyki podczas naprężania i odciążania, które uzyskano, kiedy pierścienie były spłaszczane do elipsy, wykazują typowe plateau sił pokazane na RYS.8.

Koherentne cząstki Ni₄Ti₃ powodują zniekształcenia sieci osnowy. Największe zniekształcenia występują w kierunkach prostopadłych do płaskich cząstek tj. w kierunkach osnowy typu <111> i są równe niedopasowaniu sieci obu faz δ =(d_{111p}-d_{111B2})/d_{111B2}=2.9%. Powodują naprężenia rozciągające w tych kierunkach. Prostopadle do <111>, w kierunkach [110] i [112] niedopasowanie sieci wynosi



RYS.6. Schemat nadsprężystego sprężynowego dystraktora na zdekortykowanej kości. FIG.6. Sketch of the superelastic expanding archsprings on the decorticated bone.

The superelastic plateau for the specimen deformed by 30% and annealed at 450°C for 30 minutes is shown in FIG.5. The superelastic implants for bone distraction were formed using straight wires from superelastic alloys. The implants act as expanding springs, fixed in an arches shape on the decorticated bone, are shown in FIG.6.

Superelasticity of ring distractors induced by precipitation hardening

The skull correction in the continuous distraction may be achieved using a spring in the form of a ring. A flattened ring, fixed on the skull in the form of an ellipse, implanted under skin, exert the forces in desired directions what is schematically shown in FIG.7. The rings formed from the superelastic straight wires were welded with the use of a laser beam. In the rings, prepared from alloy with 51at.% Ni content, the superelasticity was induced by age hardening. Their elastic characteristic during loading-unloading, obtained when the ring was flattened to an ellipse, shows a typical force plateau which is shown in FIG.8.



RYS. 8. Nadsprężystość pierścieni o różnych średnicach podczas uginania ich do kształtu elipsy i powrotu do wyjściowego kształtu pierścienia. FIG.8. Superelastic behaviour of the rings of different diameters while deflecting to an elliptic shape and their reversion to the previous ring shape.

The coherent Ni₄Ti₃ particles cause the matrix lattice distortions. They are the largest in the directions perpendicular to the particles axis i.e. in the <111> direction of the matrix and are equal to the lattice misfit of the both phases $\delta = (d_{111p} - d_{111B2})/d_{111B2} = 2.9\%$. They act as a tensile tension in this direction. Perpendicularly to the <111>, at the [110] and [112] directions the lattice misfit is equal 1,4% and acts as a compression stress. In result the stress distribution around the particle is inhomogeneous but symmetrical versus the <111> direction [8,9]. In accordance with the results obtained by Chumlyakov et. al. [10] the superelastic effect is induced only under the following conditions: Ni₄Ti₃



RYS.9. Cząstki fazy Ni₄Ti₃ w stopie starzonym w 500°C przez 1 godz. (a) obraz w jasnym polu, (b) elektronogram z obszaru (a) (strzałka wskazuje refleks wydzielenia), (c) wywskaźnikowany diagram elektronogramu. FIG.9. Particles of Ni₄Ti₃ phase in the alloy aged at 500°C for 1 hour (a) bright-field image, (b) diffraction pattern from the area (a) (the arrow indicates the reflection in which the dark – field image was taken), (c) indexed diagram of the diffraction pattern (b).

1,4% i działa jako naprężenie ściskające. W efekcie rozkład naprężeń wokół cząstki jest niejednorodny ale symetryczny względem kierunku <111> [8,9]. Chumlyakov i in. [10] stwierdzili, że efekt nadsprężystości jest indukowany jedynie przy spełnieniu następujących warunków: cząstki Ni₄Ti₃ są koherentne z osnową i mają rozmiary rzędu 50-100nm. Koherentne cząstki Ni₄Ti₃ są źródłem naprężeń wewnętrznych osnowy oraz miejscami uprzywilejowanego zarodkowania martenzytu i stąd prowadzą do obniżenia plateau naprężeń [11]. Jak wykazali Pelton i in. [12] parametry starzenia powinny zostać odpowiednio optymalizowane tak, aby osiągnąć maksymalną prędkość wzrostu wydzieleń.

Wydzielenia identyfikowano metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. RYSUNEK 9 pokazuje cząstki w kształcie dysków, elektronogram z tego obszaru oraz jego wywskaźnikowany diagram.

Wnioski

1. Wykazano możliwość indukowania zachowania nadsprężystego poprzez formowanie odpowiedniej struktury dystraktorów kości ze stopów NiTi.

2. Opracowano metodę kształtowania nadsprężystych pierścieni poprzez umocnienie wydzieleniowe pierścieni uprzednio ukształtowanych ze stopu Ti - 51% at. Ni.

3. Nadsprężyste sprężyny i pierścienie odkształcane przez zginanie działają ze stałą siłą w wymaganym zakresie przemieszczeń.

Podziękowania

Autorzy dziękują Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za wsparcie finansowe w formie grantu: BR – 4/RJP3/2006. particles are coherent with the B2 matrix and have the size of 50-100nm. Coherent particles of Ni₄Ti₃ are the sources of the internal stresses, sites of the preferable martensite nucleation and therefore assist the lowering of the stress plateau [11]. As shown by Pelton et al. [12] the ageing parameters should be optimized to achieve the maximum precipitation rates.

The precipitates were identified using the TEM method. FIGURE 9 shows the disc shape coherent precipitates and their diffraction pattern.

Conclusions

1. Induction of the superelastic behaviour by a proper structure formation for bone distractors was proved.

2. A method of forming the superelastic rings by the precipitation hardening of the rings previously formed out from the wires of the Ti - 51% at. Ni alloy was worked out.

3. Superelastic springs and rings deformed by bending act with a constant force in the desired displacement range.

Acnowledgements

The authors are very grateful to the Ministry of Science and High Education for financial support into the frame of the project: PBR - 4/RJP3/2006

•••• Piśmiennictwo

References

[1] Poncet P. P., Nitinol medical device design considerations. Proceedings of the International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies California 2000 pp. 441-455.

[2] Pelton A.R., Stockel D., Duerig T.W., Medical uses of NiTinol Materials Science Forum 327-328 (2000) pp. 63-70.

[3] Duerig T. W., Zadno R.: An engineers perspective of pseudoelasticity. EngineeringAspectof Shape MemoryAlloys, London 1990 pp. 369-393.
[4] C. Lauritzen, Y. Sugawara, O. Kocabalkan, R. Olsson., Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg. 32 (1998) pp.331-339.

[5] Idelsohn S., Pena S, Lacroix D, Planell S. A., Gil F. S., Continuous mandibular distraction osteogenesis using superelastic shape memory alloy (SMA). J. Mater. Sci.: Materials in Medicine 15 (2004) pp. 541-546.
[6] Lekston Z, Drugacz J, Morawiec H., Application of superelastic NiTi wires for mandibular distraction. Materials Science and Fngineering A 378 (2004) pp. 537-541.

[7] Morawiec H., Lekston Z., Kobus K., Węgrzyn M., Drugacz J., Superelastic NiTi springs for corrective skull operations in children with craniosynostosis. J. Mater. Sci. May (2007). [8] Li D. Y., Chen L. Q., Shape of rhombohedral coherent Ti11Ni14 precipitate in a cubic matrix and its growth and dissolution during constrained ageing. Acta Mater. 45 (1997) pp. 2435-2442.

[9] Tirry W, Schryvers., Quantitative determination of strain fields around Ni_4Ti_3 precipitates in NiTi. Acta Materialia 53 (2005) pp. 1041-1049. [10] Chumlyakov Yu. I., Kireeva I. V., Litviniva E. I., Lisyuk A. G., Superelasticity during the elastic twinning, slip and martensitic transformation. Proceed. of Second International Conf. on Shape Memory and Superelastic Technologies, California, 1997 pp. 29-34.

[11] Chumlyakov Yu. I., Kireeva I. V., Lysyuk A. G., Zuev Yu. L., Superelasticity and shape-memory effects in Ti-Ni single crystal. Proceed. of Second International Conf. on Shape Memory and Superelastic Technologies, California, 1997 pp. 7-12.

[12] Pelton A. R., DiCello J., Miyazaki S., Optimization of processing and properties of medical-grade Nitinol wire. Min. Invas. Ther. & Allied Technol. 9 (1) (2000) pp. 107-118.

.

ZMIANA ODPORNOŚCI KOROZYJNEJ MATERIAŁÓW PO OBRÓBCE POWIERZCHNIOWEJ DLA ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

Krzysztof Mendzik, Małgorzata Lubas, Józef Jasiński, Leopold Jeziorski, Michał Szota

INSTYTUT INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WIPMIFS, Politechnika Częstochowska, Al. Armii Krajowej 19, 42-200 Częstochowa

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 42-44]

Wstęp

Obecnie intensywnie rozwija się biomedycyna w dziedzinie rekonstrukcji uszkodzonych struktur anatomicznych i wymaga to poszukiwania nowych, lepszych biomateriałów na implanty [1]. Trwają badania nad metodami inżynierii powierzchni poprawy właściwości stosowanych już w medycynie materiałów [2]. Implanty stabilizujące w postaci koszyków, siatek, jak również oprzyrządowanie medyczne stosowane m.in. w alloplastyce stawów [3], muszą charakteryzować się dobrą odpornością korozyjną w środowisku płynów fizjologicznych [4,5]. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań odporności korozyjnej materiałów stosowanych w chirurgii ortopedycznej.

Materiał i metodyka badań

Do badań stosowano tytan techniczny (grade 1 zgodnie z normą ISO 5832-2, ASTM B 265-99) z atestem biomedycznym o składzie przedstawionym w TABELI 1.

Próbki do badań wycięto z blachy o grubości 2mm. Powierzchnię przed obróbką cieplno-chemiczną szlifowano, a następnie odtłuszczono przemywając alkoholem etylowym. Następnie przeprowadzono utlenianie tytanu w złożu fluidalnym w atmosferze powietrza przy parametrach przedstawionych w TABELI 2.

CORROSION RESISTANCE CHANGES OF MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS AFTER SURFACE TREATMENT

Krzysztof Mendzik, Małgorzata Lubas, Leopold Jeziorski, Józef Jasiński, Michał Szota

Institute of Material Engineering, Technical University of Częstochowa, Al. Armii Krajowej 19, 42-200 Częstochowa

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 42-44]

Introduction

Biomedicine is intensively developing in the field of reconstruction of damaged anatomical structures, and after it goes a need of searching new, better biomaterials, among other things for implants [1], or improving methods to receive better properties of known in this field materials [2]. Secondary hip arthroplasty needs the massive and frozen bone grafts and metal stabilizers in the form of nets and baskets [3], which have to among other things be characterized by good corrosion resistance in body fluids environment [4,5].

Experimental method

Test specimens were cut off from technical pure titanium (Ti grade 1 - ISO 5832-2, ASTM B 265-99) sheet thickness 2mm. Chemical composition of used titanium is shown in TABLE 1.

Skład chemiczny / Chemical composition [%mas]					
Fe	С	N	0	Н	Ti
0,035	0,009	0,002	0,063	0,028	reszta

TABELA 1. Skład chemiczny tytanu stosowanego do badań.

TABLE 1. Chemical composition of titanium usedin experiments.

Warun	ki utleniania /	log Z _{f=1mHz}	$\phi_{\text{f=1mHz}}$	R ₂	C ₁	R₃	n ₁
Oxidatio	on parameters	Z w Ω	deg	kΩcm ²	µF/cm ²	MΩcm ²	
Przed utlenian	iem / Before oxidation	6,5	32	2	10	4	0,94
	803 K, 8 h	6,2	40	35	0,4	7	0,86
ior r'e	833 K, 4 h	6,3	40	26	0,5	8	0,87
Iffe ut	863 K, 8 h	6,1	37	6,1	0,2	11	0,87
nia A A	893 K, 4 h	6,2	35	5,5	0,2	8	0,89
0	923 K, 8 h	6,1	28	5,7	0,1	3	0,88

TABELA 2. Dane pomiarów impedancyjnych. TABLE 2. Impedance measurements data.

Badania właściwości korozyjnych tytanu przed i po utlenianiu wykonano w roztworze Ringera o składzie: NaCl 8,6g+KCI 0,3g+CaCl₂ 0,48g w dm³ (nieodpowietrzany, temperatura pokojowa). Powierzchnię próbek przygotowano przez odtłuszczanie acetonem i zmycie metanolem bezpośrednio przed pomiarem. Elektrochemiczne pomiary korozyjne przeprowadzono w układzie trójelektrodowym: elektroda badana o pow. 1,25 cm², elektroda odniesienia: NEK, elektroda pomocnicza: siatka platynowa. Pomiar E_{kor} wykonano względem NEK przez 1h oraz po pomiarze impedancyjnym (po 4h). Pomiar impedancji przy E_{kor} po 1h ekspozycji: 50kHz÷0,5mHz, amplituda potencjału AC: 10mV do 0,5Hz, następnie 100mV, 10 punktów na dekadę częstotliwości.

Wyniki badań i ich analiza

Badania odporności na korozję przeprowadzono z zastosowaniem roztworu Ringera, który imituje warunki panujące w ciele ludzkim. Rejestrowano zmiany potencjału korozyjnego E_{kor} w czasie 1h, po tym czasie stabilizował się, a następnie rozpoczynano pomiary impedancji. Przykładowe wykresy impedancyjne przedstawiono na RYS.1.

Na wykresach impedancji nie przedstawiono krzywych dla tytanu po utlenianiu w temperaturze 863K oraz 893K. Pokrywały się one z krzywą otrzymaną dla tytanu po utlenianiu w temperaturze 833K i dla lepszej czytelności wykresu nie wstawiono ich na RYS.1.

Badania impedancji pozwoliły na wyznaczenie wartości charakterystycznych parametrów. Wyniki tych badań umożliwiają także przybliżenie budowy wytworzonych powłok tlenkowych na tytanie w aspekcie ochrony przed korozją. Otrzymane wartości danych uzyskanych w pomiarach impedancyjnych zestawiono w TABELI 2.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na występowanie dwóch stref powłok tlenkowych odpowiedzialnych za odporność na korozję. Są to strefa porowata oraz barierowa, z których ta druga odpowiada głównie za właściwości korozyjne tytanu po utlenianiu. Dla tytanu niepoddanego obróbce na krzywej impedancji występuje tylko jeden rozmyty pik, Before oxidation titanium samples were polished using 1000 grit SiC abrasive paper, followed by degreasing with ethanol. The titanium oxidation process in fluidized bed was carried out in air atmosphere using parameters shown in TABLE 2.

Studies of anodic dissolution were performed mostly in nondeaerated Ringer's solution: NaCl 8,6g+KCl 0,3g+CaCl₂ 0,48g in dm3 at ambient temperature. Bulk Ti was used for comparison purpose. Prior to the test, samples were degreased in acetone and then rinsed with methanol. Electrochemical measurements were performed using Autolab system (GPSTAT 20+FRA) with dedicated software GPES 4.4 and FRA 2.3. A three-electrode cell was used. The exposed surface area of working electrode was 1.3 cm². A saturated calomel electrode was implemented as the reference and all reported values of potential are expressed versus this electrode. Impedance spectra (amplitude: 10 mV to 0,5Hz, and then 100mV, peak to peak, frequency range: 50kHz–5mHz, 10 points per frequency decade) were taken at the corrosion potentials and selected anodic potentials, after the current was allowed to stabilize.

Results and discussion

Corrosion resistance investigations were carried out in Ringer's solution to imitate human body fluids environment. After 1h exposition to the solution corrosion potential E_{corr} was stabilized, and then there was impedance spectra made, which examples of obtained curves are shown in FIG.1.

In the impedance spectra there is not curves obtained for titanium after oxidation at 863 and 893K presented. These curves are similar to to the curve observed for titanium oxidized at 833K for 4h.

Impedance measurement gives a specify data, on the basis of which there can be obtained close view about characteristics of produced oxide coatings in corrosion resistance aspect. Data from impedance investigation is presented in TABLE 2.

Results of the investigations presented in this work suggest that oxide coatings on titanium after oxidation in fluidized bed are composed of two zones. The outer zone of the coating is porous and under it in a coating-titanium interface there is barrier zone. For untreated titanium only one wide



RYS.1. Wykresy impedancji dla tytanu przed i po utlenianiu w złożu fluidalnym: 5–923K, 8h; 6–833K, 4h; 7–803K, 8h; 8–tytan przed utlenianiem.

FIG.1. Impedance diagrams for Ti before and after oxidation in fluidized bed: 5–923K, 8h; 6–833K, 4h; 7–803K, 8h; 8–titanium before oxidation.

natomiast po utlenianiu pojawia się drugi pik przy większych potencjałach anodowania. Autorzy pracy [6] sugerują, że drugi pik widoczny na RYS.1 przy wartościach log(f) wynoszących 2÷3, może być związany z tworzeniem się strefy porowatej powłoki tlenkowej, charakteryzującej się porami zamkniętymi niedochodzącymi do powierzchni.

O grubości strefy porowatej świadczy pojemność międzyfazowa C1. Otrzymana dla tytanu bez obróbki wartość 10 jest charakterystyczna dla metali bez powłoki. Najmniejszą wartość C1 obserwuje się dla tytanu po utlenianiu w temperaturze 923K w czasie 8h, co sugeruje, że grubość strefy porowatej w powłoce wytworzonej przy tych parametrach jest największa. Mniejsze grubości tej strefy występują po utlenianiu w temperaturze 863 oraz 893 K. Natomiast wyniki dla tytanu po utlenianiu w temperaturze 803 i 833K sugerują, że grubości strefy porowatej są znacznie mniejsze. Stopień porowatości tej strefy można określić na podstawie rezystancji R2. Mniejsze wartości R₂ świadczą o większym udziale porów w powłoce tlenkowej. Wartości rezystancji strefy porowatej uzyskane dla tytanu po utlenianiu sugerują, że porowatość tych powłok jest tym większa im większa jest grubość powłoki. Porowatość powłok zależy, zatem od temperatury i czasu utleniania tytanu.

Na podstawie analizy wszystkich uzyskanych wyników w badaniach odporności na korozję trudno jest rozstrzygnąć, które z zastosowanych warunków utleniania tytanu w złożu fluidalnym dają najlepsze rezultaty w poprawie właściwości korozyjnych i wymaga dalszych badań. Jak wcześniej jednak wspomniano za odporność korozyjną odpowiada głównie strefa barierowa powstającej powłoki. Uzyskane wartości rezystancji strefy barierowej R₃, wykazały, że największą jej szczelność uzyskuje się po utlenianiu tytanu w temperaturze 863K w czasie 8 h. Najmniej odporne strefy barierowe występują na tytanie w stanie wyjściowym oraz po utlenianiu w temperaturze 923K.

Można natomiast zdecydowanie stwierdzić, że utlenianie tytanu zwiększa jego odporność na korozję w roztworze Ringera w stosunku do stanu przed obróbką cieplno-chemiczną.

Wnioski

1. Uzyskanie znacznej poprawy odporności na korozję tytanu poprzez utlenianie w złożu fluidalnym jest możliwe przez wytworzenie powłoki o dobrej szczelności strefy barierowej, nie zależnej od grubości powłoki tlenkowej. Najlepsze cechy strefy barierowej uzyskuje się po utlenianiu w temperaturze 863K w czasie 8h.

2. Otrzymywanie powłok tlenkowych na tytanie, charakteryzujących się grubością od ok. 1µm do 4,5µm i wiąże się ze wzrostem porowatości powłok. Zbyt duża porowatość pokrywających powierzchnię powłok niekorzystnie wpływa na właściwości korozyjne tytanu po utlenianiu.

Podziękowania

Praca częściowo finansowana ze środków Ministra Nauki, w ramach realizacji Programu Wieloletniego pt. "Doskonalenie systemów rozwoju innowacyjności w produkcji i eksploatacji w latach 2004 – 2008" – PW 004/ ITE/02/2005 oraz projektu badawczego 3T08C 051 29. pick was observed in impedance spectra. For oxidized samples second pick was obtained. This second pick at log(f) equal to 2÷3 can be correlated with porous zone existence in oxide coatings (pores are inside the oxide, not open to the surface) what is suggested by other authors [6].

Thickness of the porous zone could be evaluated on double layer capacitance C_1 values. C_1 equal to 10 is for metals without coating and this value was obtained for untreated titanium. The lowest rate of the capacitance was observed for titanium oxidized at 923K for 8h what suggest that thickness of porous zone and all coating is the biggest from measured samples. Much more thinner porous zones should be on titanium surfaces after oxidation at 803 and 833K, because C_1 values measured for these samples were much different from others (TAB.2). Porosity of these zones is correlated with their thickness. The thicker is porous zone the bigger is its porosity, what resistance R_2 of porous zone indicates.

Analysis of all obtained data in corrosion measurements does not give an exact answer which titanium oxidation parameters give the best surface properties in corrosion resistance aspect. However corrosion resistance is mainly dependant of barrier zone proof to aggressive environment. Values of barrier zone resistance R_3 suggest that the best properties of this zone were received after titanium oxidation at temperature 863K for 8-hour time. The least resistant barrier zones are in the oxide coating produced at 923K and on titanium before oxidation process.

There can be definitely stated that oxidation process in fluidized bed betters the corrosion properties of titanium in body fluids solution.

Conclusions

1. To receive significant increase in corrosion resistance of titanium after oxidation in fluidized bed it is important to get an oxide coating with barrier zone of proper proof properties, what does not corresponds with thickness of this coating. The best properties of barrier zone were obtained for titanium oxidized at 863K during 8h time.

2. Production of titanium oxide coatings, which thickness varies from 1 to 4,5µm, involve increasing of their porosity. Too high porosity of oxide coating unfavorably influences on corrosion properties of oxidized titanium.

Ackonwledgements

This work was partly financially supported by Polish Ministry – PW 004/ITE/02/2005 and partly by project 3T08C 051 29.

Piśmiennictwo

....

References

[1] D. Kuroda, M. Niinomi, M. Morinaga, Y. Kato, T. Yashiro; Design and mechanical properties of β type titanium alloys for implant materials, Materials Science and Engineering A243, 1998, 244+249. [2] M.C. Garcia-Alonso, L. Saldańa, G. Valles, J.L. Gonzalez-Carrasco, J. Gonzalez-Cabrero, M.E. Martinez, E. Gil-Garay, L. Munuera; In vitro corrosion behaviour and osteoblast response of thermally oxidised Ti6Al4V alloy, Biomaterials, 2003, 19+26.

[3] B. Wójcik, J. Jasiński, B. Stodolnik, L. Jeziorski, M. Lubas, T. Gaździk: System stabilizacji przeszczepu kostnego allogenicznego w protezoplastyce rekonstrukcyjnej i rewizyjnej panewek endoprotez stawu biodrowego, Inżynieria Biomateriałów nr 28, 2003.

[4] S. Król, J. Hubackova, A. Hulak: Odporność korozyjna powierzchniowo natlenionego tytanu do zastosowania na implanty. Zeszyty Naukowe Politechniki Opolskiej, Mechanika 57, 1998, 71-74
[5] J. Łaskawiec, R. Michalik: Corrosion resistance of titanium alloys for dentistry. Inżynieria Materiałowa 4, 2001, 565-567

[6] C. Jaeggi, P. Kem, J. Michler, T. Zehnder, H. Siegenthaler: Anodic thin films on titanium used as masks for surface micropatterning of biomedical devices. Surface and Coating Technology 200, 2005, 1913-1919.

MODELOWANIE ZA POMOCĄ SZTUCZNYCH SIECI NEURONOWYCH ZMIAN WŁAŚCIWOŚCI WARSTWY WIERZCHNIEJ BIOMATERIAŁÓW

Michał Szota, Józef Jasiński, Leopold Jeziorski, Małgorzata Lubas

POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA,

Wydział Inżynierii Procesowej, Materiałowej i Fizyki Stosowanej, Instytut Inżynierii Materiałowej, Zakład Biomateriałów i Inżynierii Powierzchni, 42-200 Częstochowa, Al. Armii Krajowej 19, Poland e-mail: mszota@mim.pcz.czest.pl

Streszczenie

W publikacji przedstawiono sposób projektowania struktury sieci neuronowej stosowanej do modelowania procesów obróbki cieplno chemicznej biomateriałów w złożu fluidalnym. Artykuł ten prezentuje model neuronowy stosowany do właściwości warstwy wierzchniej biomateriałów. Proces ten jest dość skomplikowany, ponieważ jest wieloparametryczny i posiada nieliniowe charakterystyki [1-2]. Fakt ten oraz brak algorytmów matematycznych opisujących ten proces czynią modelowanie, właściwości warstwy wierzchniej biomateriałów, za pomocą tradycyjnych metod numerycznych trudne, a czasami niemożliwe. W tym przypadku celowa jest próba zastosowania sztucznych sieci neuronowych.

Struktura sieci neuronowej jest projektowana oraz budowana poprzez dobór parametrów wejściowych oraz wielkości modelowanych – parametrów wyjściowych. Przedstawione zostaną metody uczenia, oraz testowania sieci neuronowej, sposoby ograniczenia liczebności struktury sieci oraz błędu uczenia i testowania. Tak przygotowany model neuronowy, po zadaniu oczekiwanych wartości parametrów warstwy wierzchniej na wyjście, dostarczy wiele informacji na temat przebiegu procesu nawęglania w złożu fluidalnym. Model neuronowy może być zastosowany do budowy systemu sterującego, kontrolującego w czasie rzeczywistym przebiegu procesu, który będzie również wspierał decyzję inżynierską.

Praca przedstawia odmienną koncepcję uzyskiwania oczekiwanych właściwości warstwy wierzchniej biomateriałów po obróbce cieplno chemicznej w złożu fluidalnym. Odpowiednio przygotowany model sieci neuronowej może być stosowany do projektowania procesów cieplno- chemicznych w złożu fluidalnym oraz kontroli przebiegu tych procesów.

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 45-47]

Wprowadzenie

Proces fluidalnej obróbki cieplno-chemicznej jest wieloparametryczny i skomplikowany, ponieważ zmiany parametrów procesu mają charakter nieliniowy. Kolejnym problemem jest brak algorytmów matematycznych, opisujących te procesy. Zastosowanie sieci neuronowych do modelowania procesów fluidalnej obróbki cieplno-chemicznej jest wynikiem szczególnych właściwości cech sieci neuronowej:

MODELING CHANGES OF PROPER-TIES OF SURFACE LAYER OF BIO-MATERIALS BY MEANS ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS

Michał Szota, Józef Jasiński, Leopold Jeziorski, Małgorzata Lubas

Czestochowa University of Technology, Faculty of Materials Processing Technology and Applied Physics, Institute of Materials Engineering, Biomaterials and Surface Engineering Research Institute, 19 Armii Krajowej Av.,42-200 Czestochowa, Poland, e-mail: mszota@mim.pcz.czest.pl

Abstract

In this publication is presented manner of designed structure of neural networks and using it for modelling of oxidations process in fluidized bed. This paper presents neural network model used for designing the properties of surface layer after thermo-chemical processes in fluidized bed. This process is very complicated and difficult as multi-parameters changes are non linear. This fact and lack of mathematical algorithms describing this process makes modelling properties of biomaterials by traditional numerical methods difficult or even impossible. In this case it is possible to try using artificial neural network.

The neural network structure is designed and prepared by choosing input and output parameters of process. The method of learning and testing neural network, the way of limiting nets structure and minimizing learning and testing error are discussed. Such prepared neural network model, after putting expected values of parameters of surface layer in output layer, can give answers to a lot of questions about running heat treatment in fluidized bed. The neural network model can be used to build control system capable of on-line controlling running process and supporting engineering decision in real time.

This paper presents different conception to obtain assumed material's properties of surface layer of biomaterials after heat treatment in fluidized bed. The specially prepared neural networks model could be a help for engineering decisions and may be used in designing thermo-chemical process in fluidized bed as well as in controlling changes of this process.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 45-47]

Introduction

.

The thermo-chemical processes in fluidized bed is multiparameters and complicated [1,2], because changes of parameters during this process have non linear characteristic. The next problem is the lack of mathematical algorithms that could describe it. Using neural networks for modelling oxidizing in fluidized bed is caused by several nets' features: • non linear character,

ability to generalize the results of calculations for data out of training set and no need for mathematical algorithms describing influence changes input parameters on hardness,
no need for mathematical algorithms describing influence changes input parameters on modelling materials properties [3-7].

nieliniowego charakteru,

 możliwości uogólniania wyników obliczeń dla danych nie zawartych w zbiorze uczącym,

 brak potrzeby stosowania algorytmów matematycznych opisujących wpływ zmian parametrów wejściowych na modelowane właściwości materiałów [3-7].

- Badania są podzielone na osiem części: • wybór modelowanych właściwości materiałów,
- wybór parametrów obróbki cieplnej,
- planowanie i zbudowanie struktury sieci neuronowej,
- · minimalizacja struktury modelu,
- minimalizacja błędów,

 zastosowanie modelu sztucznych sieci neuronowych dla prognozowania warstw wierzchnich biomateriałów po obróbce fluidalnej cieplno-chemicznej,

· praktyczna weryfikacja wyników modelu.

W prezentowanej technice modyfikacji warstwy wierzchniej materiałów zastosowano fluidalną obróbkę cieplno-chemiczną – wytwarzanie warstw powierzchniowych biomateriałów. Charakteryzuję się ona wysokim współczynnikiem przepływu masy i ciepła. Techniki te są często stosowane w instytutach badawczych i małych przedsiębiorstwach [1,8-11].

Metodyka pracy

Modelowanie procesów obróbki cieplnej z zastosowaniem sieci neuronowych rozpoczynamy od zamodelowania struktury sieci. Charakterystyczne cechy sieci neuronowych to: numer warstw, ilość neuronów w warstwie i rodzaj połączeń. Liczba neuronów w wejściowej warstwie i liczba neuronów wejściowych parametrów użytych w równaniu. Dla procesu wytwarzania warstw powierzchniowych biomateriałów wynosi ona 7 (n=7).

Liczba wyjściowej warstwy jest równa z liczbą modelowanych parametrów. W tym przypadku wyjściowe neurony warstwy są podzielone na cztery sekcje, co pokazano na RYS.1. Ilość sekcji jest uzależniona od przyjętych właściwości warstwy wierzchniej materiału.

Po ustaleniu wejściowej i wyjściowej struktury sieci, następnym krokiem jest modelowanie wewnętrznych warstw modelu. Matematyczne algorytmy opisujące zależność pomiędzy wektorami x_n i y_k , które nie są znane, nie są konieczne podczas stosowania niekonwencjonalnych sposobów budowy sieci neuronowych. To jest informacja oparta na danych wejściowych i wyjściowych.

Problem teoretycznego wyboru struktury sieci ogranicza się do znalezienia wielo-czynnikowej funkcji aktywacji dla zadanego wektora wejściowego x_n [3]. Prezentowany w tej pracy przypadek charakteryzuje się wielowymiarowym wektorem wejściowym i ciągłą funkcją aktywacji.

Ten model sieci neuronowej został zbudowany przez Kołmogorowa [12]. Udowodnił on, że otrzymane inne k-wymiarowe wektory wyjściowe y_k dla n-wymiarowych wektorów wejściowych x_k oraz ciągła funkcja aktywacji używa jednej ukrytej warstwy sieci wykorzystując wystarczające neurony 2n+1.

BIOMATERING OF



The researchers are divided into eight stages:

· choosing modelling properties of materials

choosing heat treatment parameters to prepare data input vector

using special computer system to obtain training data set,

- · designing and building neural network structure,
- minimizing model structure and learning error,
- minimizing testing error,
- using neural network model for prediction oxygen layer thickness of material after heat treatment in fluidized bed,
- practical verification of modelling results.

At present techniques of modification of surface layer of biomaterials are used in the thermo chemical treatment. One of this is oxidizing in fluidized bed. This is characterized by high coefficient heat and mass transfer. These techniques are very often used in researching institutes and small industrial plant [1,8-11].

Work methodology

Modelling the process using neural networks can be started with designing the structure of the network. The characteristic features of neural nets are: the number of layers, the number of neurons in each layer and kinds of neural connections. The number of neurons in input layer and the number of input parameters are usually equal. For oxidizing steel process in fluidized bed n=7. Particular neural networks inputs are described particular variables data inputs, such as:

The size of output layer is equal with number of searched parameters. In this case neurons in output layer are divided into four sections shown in FIG.1. The quantity of section is depend on assumed properties of surface layer.

After fixing the input and the output layer structure the next step is designing the inside layers of the model. As mathematic algorithms describing correlations between vectors x_n and y_k are not known it is necessary to use an unconventional way of building the neural nets. It is based on information about output and input.

Theoretically the problem of choosing neural structure is restricted to approximation of multi-variable function for given vector x_n [3]. The case discussed in this paper concerns multi-dimensional input vector and continuous activation function. Building that kind of neural network model is defined by Kołmogorow statement [12]. He proved that in order to obtain k-dimensional output vector y_k for n-dimensional input vector x_n and continuous activation function, using one hidden layer neural network built of 2n+1 neurons is sufficient. Kołmogorow didn't define activation function algorithm, because it is chosen for a particular process likewise the number of hidden layers which changes in range from n to 3n.

RYS.1. Struktura sieci neuronowej zgodnie z twierdzeniem Kołmogorowa, gdzie:

 $\begin{array}{l} X=[x_1, x_2, ..., x_n] - n - wymiarowy wektor wejściowy; \\ Y=[y_1, y_2, ..., y_k] - k - wymiarowy wektor wyjściowy; \\ z_1, z_2, ..., z_{2n+1} - neurony warstwy ukrytej. \\ FIG.1. Structure of neural network for modelling pro-$

perties of surface of biomaterials in accordance with Kołmogorow statement, where: X=[$x_1, x_2,...,x_n$] – n – dimensional input vector;

 $Y=[y_1, y_2,..., x_k] - k - dimensional imput vector;$ $z_1, z_2,..., z_{2n+1} - hidden layer neurons.$ Kołmogorow nie zdefiniował algorytmu funkcji aktywacji, ponieważ nie wybrał dla poszczególnych procesów liczby ukrytych warstw, które są zmienne w zakresie n - 3n.

Rezultaty modelowania za pomocą sztucznych sieci neuronowych

Sieć neuronowa może przewidywać właściwości warstwy wierzchniej biomateriałów z błędem od 4,5% – 6,8%. Taki wynik umożliwia zastosowanie sieci neuronowych, projektowanych tą metodą, do projektowania oczekiwanych właściwości warstw wierzchnich biomateriałów po obróbce cieplno-chemicznej w złożu fluidalnym.

Wnioski

Sieć neuronowa zbudowana i stosowana podczas tych badań pozwoliła na modelowanie właściwości warstwy po procesach obróbki cieplnej i cieplno chemicznej w złożu fluidalnym. Wyniki otrzymane tą drogą porównano z wynikami otrzymanymi po przeprowadzonych obróbkach cieplnych lub cieplno chemicznych w złożu fluidalnym.

Powyższe badania będą kontynuowane dla kompleksowego rozwiązania problemu. Wynikiem końcowym będzie opracowany specjalny system komputerowy, połączony w czasie rzeczywistym z oprzyrządowaniem stanowiska obróbki cieplnej. Połączenie to umożliwi ciągłe wzbogacanie bazy danych uczących i testujących. Bezpośrednie połączenie sieci neuronowej, w czasie rzeczywistym, z systemem sterującym pozwoli na ciągłą kontrolę zmian parametrów procesu [14-15] oraz będzie wsparciem podczas podejmowania decyzji inżynierskich.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministra Nauki, w ramach realizacji Programu Wieloletniego pt. "Doskonalenie systemów rozwoju innowacyjności w produkcji i eksploatacji w latach 2004 – 2008" – PW004/ITE/02/2005

Piśmiennictwo

 J. Jasinski, Oddzialywanie zloza fluidalnego na procesy nasycania dyfuzyjnego warstwy wierzchniej stali, Wydawnictwo WIPMiFS, Czestochowa 2003

[2] J. Jasinski, L. Jeziorski, M. Kubara, Carbonitriding of steel In fluidized beds, Heat Traetment of Metals, Vol. 12, nr 2, 1988
[3] S. Osowski, Sieci neuronowe do przetwarzania informacji, Oficyna Wydaw. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003
[4] L. Rutkowski Sieci neuronowe i neurokomputery, Wydawnictwo Politechniki Czestochowskiej, Czestochowa, 1996
[5] J. Trzaska, L.A. dobrzanski, Application of neural networks for designing the chemical composition of steel with the assumed hardness after cooling from the austenitising temperature, Journal of Materials Processing Technology 164-165, 2005
[6] W. Sitek, L.A. Dobrzanski, Application of genetic method in

materials' design, Journal of Materials Processing Technology 164-165, 2005 [7] L.A. Dobrzanski, M. Kowalski, J. Madejski, Methodology

of the mechanical properties prediction for the metallurgical products from the engineering steels Rusing the Artificial Intelliegence methods, Journal of Materials Processing Technology 164-165, 2005

[8] Z. Rogalski, Obrobka cieplna fluidalna – stan techniki, czesc 1, Inzynieria Powierzchni nr 2, Warszawa 2000

Results of neural network modeling

Neural network can predicts values of properties with average error in range 4,5%–6,8%. This result makes possibility that prepared in that way neural network can be used to design assumed surface layer of biomaterials after process in fluidized bed.

Conclusions

Neural network developed and used in this research is able to modelling properties of surface layer after thermo and thermo-chemical processes in fluidized bed. In accordance with empirical obtained properties of biomaterials, surface layer of research biomaterials is computed. After compared this results with results obtained by neural network modelling, error of prediction is computed.

This research will be continued to complex solve this subject and applied it in Industrial plant. The final solution will be special computer system, which will be connected in real time [13] with heat medium and gas distribution station. This connection and special work application make to possible to add new date in training and testing data. Connection of this system whit heat treatment control system makes to possible on-line control running process [14-15] and support engineering decision in real time.

Ackonwledgements

The studies were financially supported by project No PW-004/ITE/02/2005

References

[9] T. Babul, A. Nakonieczny, Z. Obuchowicz, D. Orzechowski, J. Jasinski, L. Jeziorski, T. Fraczek, R. Torbus, Przemyslowe zastosowanie wizualizacji i sterowania komputerowego piecami do obrobki cieplnej i cieplno-chemicznej, Inzynieria Materialowa, nr 5, 2002

[10] J. Jasinski, L. Jeziorski, T. Fraczek, R. Torbus, P. Chrzastek, T. Babul, A. Nakonieczny, Z. Obuchowicz, Komputerowy system sterowania i wizualizacji procesami F-A/O-D w wersji laborato-ryjnej, Inzynieria Materialowa, nr 5, 2002,

[11] J. Jasinski, System wizualizacji i sterowania procesow obrobki cieplno-chemicznej w wersji laboratoryjnej, Biuletyn Automatyki ASTOR, Automatyka, Sterowanie i Organizacja Produkcji, Krakow 2004

[12] S. Haykin, Neural networks, a comprehensive foundation, Macmillan College Publishing Company, New York, 1994,
[13] Joon-Sik Son, Duk-Man Lee, III-Soo Kim, Seung-Gap Choi, A study on on-line learning neural networks for prediction for rolling force in hot-rolling mill, Journal of Materials Processing Technology 164-165, 2005,

[14] Svietlicznyj D., Pietzryk M., On-line Model of Thermal Roll Profile during Hot Rolling, Metall. Foundry Eng., 1, 27 2001,
[15] J. Kusiak, Pietrzyk M., Svietlicznyj D., Application of artificial neural network in on-line control pf hot flat folling processes, Int. Journal Engineering Simulation, 1, 3, 2000.

```
. . . . . . . . . . . . . . .
```

BIOAKTYWNA SZKŁO–CERAMIKA NOWEJ GENERACJI JAKO SUBSTYTUT KOŚCI – BADANIA W WARUNKACH *IN VIVO*

Kryspin Niedzielski¹, Rafał Sindut², Katarzyna Cholewa – Kowalska³, Maria Łączka³, Justyna Kokoszka³

¹ Katedra Ortopedii, Akademia Medyczna, Łódź
 ² Instytut Szkła i Ceramiki, Oddział Kraków
 30-702 Kraków, ul. Lipowa 3
 ³ Akademia Górniczo – Hutnicza
 Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,
 30-059 Kraków

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 48-51]

Wstęp

Bioaktywne szkła i szkło – ceramika są niezwykle interesującymi materiałami wykorzystywanymi w medycynie i stomatologii jako substytut kości. W środowisku fizjologicznym wytwarza się na ich powierzchni warstwa hydroksyapatytu, poprzez którą implant zastaje trwale połączony z kością. Nowa generacja tych materiałów, otrzymywanych metodą zol- żel charakteryzuje się podwyższoną bioaktywnością i może być stosowana w formie granul, pokryć oraz porowatych spieków. Celem badań było otrzymanie bioaktywnych porowatych spieków z proszków układu CaO–SiO₂–P₂O₅ otrzymanych metodą zol –żel, oraz potwierdzenie ich bioaktywności *in vivo*.

Materiały i metody

Badaniom zostały poddane biomateriały pochodzenia żelowego o różnych składach chemicznych oznaczonych symbolami: S2 bioszkło o wysokiej zawartości krzemionki (80%mol.SiO₂, 16%mol.CaO, 4%molP₂O₅) oraz A2 – materiał szkło–krystaliczny o wysokiej zawartości wapnia. Materiały te otrzymano metodą zol – żel w postaci proszków o frakcji 2µm. Następnie proszki poddano spiekaniu metodą wypalania dodatków i osadzania masy lejnej na gąbce polimerowej. Spiekanie przeprowadzono w kilku etapach, w maksymalnej temperaturze 1200 °C. Otrzymane materiały zostały scharakteryzowane ze względu na skład fazowy (RYS.1), gęstość i porowatość otwartą (TAB.1).

W celu oceny bioaktywności otrzymanych spieków, przeprowadzono testy *in vitro* w symulowanym osoczu ludzkim SBF (o składzie jonowym zbliżonym do składu ludzkiego osocza) (RYS.2).

Do badań *in vivo* zostały wykorzystane porowate cylindryczne próbki o wymiarach 5x5mm (średnica i wysokość) wykonane z S2 i A2. Otrzymane próbki zostały wszczepione w ubytki kostne królików. Po 3 i 6 miesiącach od zabiegu operacyjnego króliki uśmiercono, następnie pobrano kości z wypełnionym ubytkiem i poddano je ocenie radiologicznej (RYS.3,4) oraz analizie SEM/EDAX (RYS.5,6).

Wyniki badań

Zastosowana metoda otrzymywania bioaktywnych spieków z proszków żelowych z użyciem gąbko polimerowej, dała dobre rezultaty, dzięki czemu otrzymano materiały o zadowalającej mikrostrukturze, które można stosować w medycynie jako implanty kości.

NEW GENERATION BIOACTIVE GLASS-CERAMICS AS A SUBSTITUTE OF BONE – IN VIVO STUDY

Kryspin Niedzielski¹, Rafał Sindut², Katarzyna Cholewa – Kowalska³, Maria Łączka³, Justyna Kokoszka³

¹ Unit of the Children Orthopaedics and Traumatology, Medical University, Lodz, Poland, ² Institute of Glass and Ceramics, Cracow Branch, 30-702 Cracow, ul. Lipowa 3, Poland ³ AGH-University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, 30-059 Cracow, Ave Mickiewicz 30, Poland

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 48-51]

Introduction

Bioactive glasses and glass-ceramics are very interesting materials used in medicine and dentistry as a substitute of bone. These materials, when in contact with the body fluids form on their surface a layer of hydroxyapatite, through which the material used as the implant, forms a permanent bond with the bone in a living organism [1]. New generation of these materials, obtained by sol-gel process, characterize of high bioactivity and can be used as a substitution of bone tissue in the various forms, as powders, coatings and porous sinters [2,3]. The purpose of these studies was to obtain bioactive porous sinters from gel-derived powders of CaO-SiO₂-P₂O₅ system and confirm their bioactivity *in vivo*.

Materials and methods

The object of examinations were gel-derived biomaterials of different chemical compositions designated as: S2 – high silica bioglass (80%molSiO₂, 16%mol.CaO, 4%mol.P₂O₅) and A2 – high lime glass-crystalline material (40%mol SiO₂, 54%mol.CaO, 6%mol.P₂O₅). These materials were prepared by sol-gel method in the form of powders of 2µm grain fraction. Next the powders were sintered using a method of burning additions and deposition of the casting slip on the polymeric sponge. Sintering was realized in several stages, at the maximum temperature 1200°C. Then the obtained materials were characterised with respect to phase composition (FIG.1), density and open porosity (TAB.1).

In order to evaluation of bioactivity of obtained sinters, test *in vitro* in simulated body fluid SBF (of chemical composition close to human plasma) was conducted (FIG.2).

For *in vivo* examinations cylindrical porous samples of 5x5mm dimension (diameter and height) made of S2 and A2 materials were used. These samples were implanted into bone defects of rabbit. After 3 and 6 months since the time of operation, the rabbits were killed and the bone preparations were examined by means of radiological observation (FIGs.3,4) and SEM/EDAX analysis (FIGs.5,6).

Results and discussion

The applied method of obtaining bioactive sinters from gel-derived powders using polymeric sponge has proved to be a good way of preparing materials with a favorable microstructure for medical application as bone implants.



RYS. 1. Dyfraktogram proszków S2 i A2 A - apatyt, W - wollastonit, C - krystobalit. FIG.1. X-ray diffraction patterns of A2 and S2 sinters A - apatite, W - wollastonite, C - crystobalite.

Otrzymane spieki charakteryzowały się wysoką porowatością otwartą powyżej 60% oraz dużą ilością porów otwartych o wymiarach od 100 do 150µm (TAB.1). Struktura taka sprzyja rozrostowi tkanki kostnej wewnątrz implantu.

Po spiekaniu materiał A2 wykazywał obecność fazy szklistej oraz hydroksyapatytu i wollastonitu jako faz krystalicznych, natomiast materiał S2 zawierał fazy: szklistą, krzemianu wapnia oraz krystobalitu (RYS.1).

Otrzymane spieki poddane zostały badaniu w symulowanym płynie fizjologicznym SBF, w celu określenia stopnia bioaktywności. Badania wykazały, iż jedynie w przypadku spieków proszków z najwyższą zawartością wapnia (A2), została zaobserwowana krystalizacja fosforanu wapnia na powierzchni (RYS.2).

Badane materiały zostały wszczepione w ubytki kostne królików i poddane obserwacji przez 6 miesięcy. Podczas tego okresu granica pomiędzy zaimplantowanymi spiekami S2 i A2 a tkanką kostną była niezauważalna, co dowodzi dobrego połączenia między tkanką a implantem przez warstwę hydroksyapatytu.

Z oceny obserwacji radiologicznych wynika, iż próbki S2 były nieco lepiej powiązane z ubytkiem kostnym, nie zaobserwowano procesu niszczenia kości. W kilku próbkach A2 wykazano nieznaczną osteolizę.

Z przeprowadzonych badań SEM/EDAX wynika iż spieki S2 i A2 miały wpływ na odbudowę kości oraz zostały związane z tkanką kostną przez warstwę hydroksyapatytu. (RYS.5,6)

Otrzymane wyniki pokazują, że tworzenie się hydroksyapatytu na powierzchni biomateriału w badaniach w symulowanym płynie fizjologicznym SBF, nie jest niezbędne do wytworzenia trwałego wiązania pomiędzy implantem a kościom w warunkach *in vivo*.

Rezultaty badań *in vivo*, potwierdzają bioaktywność obu badanych materiałów S2 i A2.

Wnioski

1. Proszki pochodzenia żelowego z układu SiO₂–CaO–P₂O₅ mogą być właściwymi materiałami wyjściowymi do otrzymywania wysoko porowatych spieków przeznaczonych na implanty.

	S2	A2
Gęstość helowa / Helium density [g/cm3]	2,9	3,5
Porowatość otwarta / Open porosity [%])	38.2	60.8
Porowatość ogolna / Total porosity [%]	55,0	77,8

TABELA 1. Gęstość helowa i porowatość otrzymanych materiałów. TABLE 1. Helium density and porosity of the obtained materials.

The obtained sinters were characterized by high open porosity up to 60% and the presence of high amount of open pores with diameter between 100 and 150µm (TAB.1). This structure creates favorable conditions for the bone tissue to grow inside the implant. After sintering, the A2 material contains glassy phase, hydroxyapatite and wollastonite as crystalline phases, while S2 material contains glassy phase, calcium silicate and cristobalite (FIG.1).

The obtained sinters were tested *in vitro* in simulated body fluid SBF in order to preliminary estimate their bioactivity [4]. It has been found that only in the case of sinter of highest calcium concentration (A2) crystallization of calcium phosphates on the surface of biomaterial was observed (FIG.2).

The materials were implanted to rabbit bone and observed during 6 months. During the observation of implanted sinters S2 and A2 the boundary implant-bone tissue was almost not noticeable which proves good fixation of the implant in the tissue by hydroxyapatite interface [5].

Radiological observations showed that S2 samples are slighty better incorporated into bone defects and osteolysis (widening of bone/implant contact) was not observed. In a few A2 samples there were observed little osteolysis (FIGs.3,4).

From SEM/EDAX examinations it follows that S2 and A2 sinters influence likely on rebuilding of bone and both sinters are fixed in bone tissue by hydroksyapatite interface (FIGs.5,6).

Our results showed that HAp formation on biomaterials surface in SBF test is not necessary to form stable bond between implant and bone *in vivo* conditions. Results of *in vivo* study confirmed the bioactivity of both examined materials.

Conclusions

1. Gel derived powders of SiO₂-CaO-P₂O₅ system are proper starting materials for obtaining highly porous sinters which can be used as bone implants.

2. The method of burning additions and deposition of the casting slip on the polymeric sponge allows to obtain strong sinters with high open porosity and open pores regularly distributed in the material.

3. During 14 days of *in vitro* test in SBF HAp formation occurs only on the surface of A2 sinter of high calcium concentration.

4. Radiological observation and SEM/EDAX examinations of sinters implanted to rabbit bone defect showed their good fixation in bone tissue probably by hydroxyapatite interface either in the case of S2 and A2 sinter.

5. Results of *in vivo* study confirmed the bioactivity of both examined materials.

6. The results of *in vivo* study showed that formation of HAp on biomaterials surface in SBF test does not exclude stable bond between implant and bone in *in vivo* conditions.



RYS.2. Morfologia powierzchni oraz analiza EDAX spieku A2 przed (a) i po (b) 7 dniach kontaktu z płynem fizjologicznym.

FIG.2. SEM observation and EDAX analysis of A2 sinter before (a) and after (b) 7 days contact with SBF.



RYS.3. Obserwacja radiologiczna ubytku kostnego wypełnionego materiałem S2. Implant szczelnie i trwale połączony z tkanką kostną.

FIG.3. Radiological observation of rabbit bone filled with S2 material. The implant was overgrown tightly with osseous tissue.



RYS.4. Obserwacja radiologiczna ubytku kostnego wypełnionego A2. Trwałe połączenie implantu z kością, widoczny jest jednak niewielki obszar osteolityczny.

FIG.4. Radiological observation of rabbit bone filled with A2 material. The implant was fixed in bone, but there was visible a little place with osteolysis.

50

TERIALS



RYS.5. Morfologia powierzchni kości z wypełnieniem S2; i–implant, k-kość, strzałki–granica faz. Powierzchnia pokryta hydroksyapatytem. Obraz mikroskopowy SEM w systemie CAMEO. FIG.5. SEM observation the area of implanted S2 material; i-implant, k-bone, arrows-interface area. All surface was covered with HAp.

2. Metoda wypalania dodatków i osadzania masy lejnej na gąbce polimerowej pozwala uzyskać wytrzymałe spieki z wysoką porowatością otwartą, z porami równomiernie rozmieszczonymi w materiale.

3. Po 14 dniach inkubacji w symulowanym płynie fizjologicznym SBF, jedynie na spiekach z wysoką zawartością wapnia A2 zaobserwowano powstawanie hydroksyapatytu.

4. Przeprowadzona ocena radiologiczna oraz analiza SEM/ EDAX ubytków kostnych z wypełnieniem, obrazuje dobre wiązanie z tkanka kostną prawdopodobnie poprzez warstwę hydroksyapatytu, zarówno w przypadku S2 jak i A2.

5. Rezultaty badań *in vivo* potwierdziły bioaktywność obu materiałów.

6. Wyniki badań *in vivo* wskazują, iż do wytworzenia trwałego wiązania pomiędzy implantem a kością w warunkach *in vivo*, nie jest konieczne powstawanie hydroksyapatytu na powierzchni biomateriału w testach w symulowanym płynie fizjologicznym SBF.

Podziękowania

Badania prowadzono w ramach realizacji projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych No: 3 T08A 075 28.

Piśmiennictwo

[1] Kokubo, T., Kushitani, H., Ohtsuki C. & Sakka, K. J. Mater. Sci. Mat. in Med., 1992, 3, 78.

[2] Li R., Clark, A.E. & Hench, L.L. J. Appl. Biomas, 1991, 2, 231.
[3] Laczka, M., Cholewa-Kowalska, K., Laczka-Osyczka, A.M. & Tworzydlo, M. J. Biomed. Mat. Res. 2000, 52, 601.



RYS.6. Morfologia powierzchni kości z wypełnieniem A2; i–implant, k–kość, strzałki–granica faz, a–naczynie krwionośne.

Obraz mikroskopowy SEM w systemie CAMEO. FIG.6. SEM observation the area of implanted A2 material; i-implant, k-bone, arrows - interface area, a-blood vessel. All surface was covered with HAp.

Acknowledgements

This investigations are financial supported by the Polish State Committee for Scientific Research project No: 3 T08A 075 28.

References

[4] Kokubo T., Takadama H., Biomaterials 2006, 27,
[5] Wheeler D.L., Stokes K.E., Park H.M., Hollinger J.O., J. Biomed. Mater. Res. 1997, 15, 95.

.

52

WPŁYW ŚREDNICY WŁÓKIEN WĘGLOWYCH NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ

I. Rajzer¹, M. Błażewicz², E. Menaszek³, A. Czarny⁴, E. Zaczyńska⁴

¹ Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsko-Białej, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych
² Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Kraków, Polska
³ Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Zakład Cytobiologii i Histochemii, Kraków, Polska
⁴ Państwowa Akademia Nauk, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej, Wrocaw, Polska

Streszczenie

W ramach pracy otrzymano włókninę zbudowaną z włókien o różnych średnicach i wielkości, której mikrostruktura posiada biomimetyczny charakter, tzn. składa się z włókien o średnicach zbliżonych do średnic włókien występujących w tkankach. Badania biologiczne wykazały, że włókna o niskich średnicach są gorzej tolerowane przez tkanki.

Słowa kluczowe: włóknina węglowa, porowatość, podłoża tkankowe, badania biologiczne.

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 52-56]

Wstęp

Materiały włókniste znajdują coraz większe zastosowanie w medycynie jako trójwymiarowe podłoża w regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej i kostnej. Projektując materiał przeznaczony na podłoże tkankowe należy pamiętać, że powinien on posiadać przestrzenną, porowatą strukturę o rozmiarze porów optymalnym dla wzrostu i proliferacji określonego typu komórek. Materiał taki powinien charakteryzować się zarówno porowatością w skali mikro, sprzyjajaca odżywianiu komórek, jak również porowatościa w skali nano sprzyjającą adhezji komórek do powierzchni. Porowate lub włókniste podłoża dla hodowli tkanki, oprócz pożądanych własności biologicznych, fizycznych czy mechanicznych powinny posiadać budowę zbliżoną do zastępowanych tkanek [1]. Coraz częściej poszukiwane są tzw. materiały biomimetyczne. Wyzwaniem dla inżynierii tkankowei iest zaprojektowanie idealnego skafoldu, który naśladowałby strukturę i biologiczne funkcje substancji międzykomórkowej. Niemal wszystkie z ludzkich tkanek i organów osadzone są w strukturach włóknistych (włókna kolagenowe stanowią podstawowy składnik tkanki łącznej). Zatem implant w postaci włókniny weglowej o różnej średnicy włókien (naśladującej włókna kolagenowe) powinien być pomocny przy próbach regeneracji różnych tkanek ludzkich [2-3].

Celem pracy było wytworzenie specyficznego rodzaju trójwymiarowych biomimetycznych rusztowań o porowatości w zakresie mikro- i nanoporów, w których zarówno układ, jak i średnice włókien inspirowane są sposobem ułożenia i średnicami włókien występującymi w żywych tkankach.

THE EFFECT OF THE CARBON FIBRES DIAMETER ON CELL RESPONSE

I. Rajzer¹, M. Błażewicz², E. Menaszek³, A. Czarny⁴, E. Zaczyńska⁴

¹ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,

Faculty of Materials and Environmental Sciences, Institute of Textile Engineering and Polymer Science ²AGH University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, Department of Biomaterials, Cracow, Poland ³Jagiellonian University, Collegium Medicum, Department of Cytobiology and Histochemy, Cracow, Poland ⁴PAN Polish Academy of Sciences, Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wroclaw, Poland

Abstract

A three dimensional fibrous material, made from fibers differing in diameters and porosity, has been designed and prepared. These materials will constitute a 3D scaffold containing fibrous components mimicking the structure of natural tissue.

The biological studies indicate that the fibers with bigger diameter allow for more intense and quick regeneration of surrounding tissue.

Keywords: carbon fabrics, porosity, tissue engineering scaffolds, biological study.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 52-56]

Introduction

Among the possible forms of implants, the fibrous matrix is highly promising in medicine for tissue regeneration as a cell supporting scaffold. It is well known that material which could serve as a scaffold should allow for adherence, growth, proliferation and differentiation of cells. The best scaffold should be made of porous materials containing two types of pores: 1) larger than several tenths of micrometers (pores in which cells can grow) and 2) smaller pores enabling cell-adhesion. Scaffolds should exhibit sufficient physical and mechanical properties and promote the formation of tissues. The aim of tissue engineering is to design the ideal scaffold imitating the structure and functions of extra-cellular matrix. Almost all natural tissues and organs are supported by fibrous structures (e.g. collagen fibres are the main component of connective tissues). Therefore, fibrous scaffolds made from fibres differing in diameters, may be used as a promising material in tissue engineering applications due to their biomimetic character and highly porous structure.

The aim of this work was to prepare materials in the form of three dimensional fibrous structure made from fibres differing in diameters and porosity (micro- and nanopores). These materials will constitute a 3D scaffold containing fibrous components imitating the structure existing in natural tissues.

BIOMATERING OF

Materiały i metody

Porowaty prekursor poliakrylonitrylowy wytworzono w Katedrze Włókien Sztucznych Wydziału Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej w formie rovingu oraz włókniny. Włóknina zawierała oprócz włókien porowatych również włókna nieporowate o zróżnicowanych średnicach.

Proces karbonizacji włóknin poliakrylonitrylowych prowadzono do temperatury 1000°C przy szybkości ogrzewania 5°C/min. w atmosferze ochronnej (argon). Włókna przetrzymywano w maksymalnej temperaturze przez 15 minut. Karbonizacji poddano również włókninę nieporowatą wytworzoną z włókien o jednakowej średnicy.

Po procesie karbonizacji włókniny (WP – włóknina porowata, WN – włóknina nieporowata) i włókna (W/Por) badano przy użyciu mikroskopu skaningowego. Badania średnicy włókien węglowych tworzących włókninę oraz porowatych włókien węglowych (W/Por) występujących w postaci rovingu przeprowadzono na mikroskopie projekcyjnym Lanametr. Przy zastosowaniu metody porozymetrii rtęciowej wyznaczano porowatość włóknin oraz włókien tworzących włókninę WP. Dla porównania, badania porowatości przeprowadzono również dla włókniny węglowej WN.

Próbki w kształcie kwadratów o wymiarach 0,5x0,5cm, sterylizowano termicznie w 160°C w czasie 120 minut.

Otrzymane materiały poddano ocenie biologicznej. Badanie cytotoksycznego działania próbek na komórki wykonano w Laboratorium Wirusologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej - PAN we Wrocławiu. Próbki węglowe kontaktowano z linią komórek nabłonkopodobnych ludzkiego raka płuc A549 (ATCC CCL 185). Hodowla komórek nabłonkowych ludzkiego raka płuc została założona w 24-dołkowej płytce hodowlanej firmy Constar. Gęstość komórek w hodowli wynosiła 1x10⁶/ml. Komórki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie usunięto pożywkę hodowlaną, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano 1ml płynu hodowlanego z dodatkiem 2% surowicy cielęcej.

Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów i inkubowano przez 24 oraz 72 godziny w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Zmiany występujące w komórkach, pod wpływem badanych materiałów, oceniano w trzech powtórzeniach po każdym czasie inkubacji, w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. Wpływ działania cytotoksycznego materiału na hodowlę komórek obejmował ocenę ilościową i jakościową. W celu określenia liczby martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu.

Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach rasy kapturowej, pochodzących ze zwierzętarni eksperymentalno–hodowlanej Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Badania wykonano w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii CM UJ. Sterylne próbki materiałów węglowych (sterylizacja termiczna: 160°C/120 minut) wszczepiano do naciętego mięśnia szkieletowego pośladkowego szczurów. Badania wykonano w 5 seriach. Po upływie czasu danej serii (7, 30, 90, 150, 210 dni) zwierzęta zabijano, a wycinki pobrane z miejsc wszczepów zamrażano w ciekłym azocie i następnie skrawano na mikrotomie kriostatowym Pearse – Slee na skrawki o grubości 8µm. Badania obejmowały mikroskopowe obserwacje strefy wgajania implantów.

Wyniki i dyskusja

Zdjęcia z mikroskopu skaningowego włókniny węglowej zawierającej porowate włókna (oznaczanej jako WP) przedstawione są na RYS.1.

Materials and methods

Porous polyacrylonitrile precursor (PAN) was prepared in the form of fabrics and fibres at the Technical University of Łódź in the Department of Man Made Fibres. The fabrics (WP) was comprised of porous fibres (W/Por) and nonporous fibres of different diameters. Carbonization of the polyacrylonitrile fabrics took place at 1000°C for 15 min. at a heating rate of 5°C/min. Carbonization was proceed also for nonporous fabrics (WN) made from fibres of similar diameter.

After the carbonization process, the fabrics' morphology was examined by means of the scanning electron microscope (SEM).

The diameter of the carbon fibres (which constituted the WP fabrics) and the diameter of the porous carbon fibres W/Por (in the form of roving) was measured by means of the Lanametr microscope.

The porosity of the WP fabrics and of the porous fibres W/Por (which were used to produce WP fabrics) was determined by a mercury porosimeter (Carlo – Erba 2000). For reference purposes, similar material prepared from polyacrylonitrile precursors as well, but without the porous fibres was used in this study.

Square pieces of fabrics (0,5x0,5cm) were sterilized in a dry hot air sterilizer $(160^{\circ}C/120 \text{ min.})$ and used in a biological study.

The cytotoxicity tests were performed at the Polish Academy of Sciences, Institute of Immunology and Experimental Therapy in Wrocław.

The cytotoxicity of the carbon fabrics was determined in the culture of human lung adenocarcinoma cell line A549. For the cytotoxicity test, the A549 cells were seeded in a 24-well plate (Costar). 1×10^6 cells in 1 ml of the culture medium enriched with 2% calf serum, penicillin and streptomycin were deposited into each well. Samples of the tested materials in the amount of 10mg were added to plate wells, and incubated with cells at 37°C in an air atmosphere containing 5% CO₂. The number of cells and changes of their morphology were estimated after 24 and 72 hours. Each sample was evaluated three times. Trypan blue staining was used for assessment of cells viability.

The *in vivo* studies were carried out using rat soft tissues as a model. The biological tests were performed at the Collegium Medicum of Jagiellonian University, Department of Cytobiology and Histochemistry in Cracow. The *in vivo* study was approved by Bioethics Committee. Sterile pieces of carbon fabrics were implanted into the skeletal muscle of adult Hooded-Oxford rats. After 7, 30, 90, 150 and 210 days from implantation, the animals were sacrificed and tissue blocks containing biomaterials were excised. Samples were frozen in liquid nitrogen and cut in a Pearse – Slee cryostat microtome. The studies involved microscopic observations of the implant healing site, particularly the tissue-implant interface.

Results and discussion

The microstructure of the carbon fabrics (WP) made from porous fibres is shown in FIG.1. The fibres of different diameters and the pores between the fibres are clearly seen. Elongated pores of various sizes are found on the surface of carbonized fibres. The analysis of the fibres cross-section shows that the pores occurred at the outer layer of the fibres and formed irregular channels along the fibre axis. The smooth fibres with lower diameters (even less than 2μ m) were also observed.



RYS.1. Mikrostruktura włókniny węglowej (WP) i włókien (W/Por). FIG.1. Microscopic image of carbon fabrics (WP) and fibres (W/Por).

Na zdjęciach widoczne są włókna o różnej średnicy i przypadkowym ułożeniu, pomiędzy którymi znajdują się pory. Również na powierzchni włókien występują podłużne pory o zróżnicowanej wielkości. Analiza przekroju poprzecznego włókna wskazuje, że pory występują przede wszystkim w zewnętrznej warstwie włókien i tworzą nieregularne kanaliki biegnące wzdłuż osi włókien. We włókninie występują również włókna gładkie o mniejszej średnicy, a nawet włókienka o średnicy poniżej 2µm (RYS.2).

Z pomiarów przeprowadzonych na mikroskopie projekcyjnym Lanametr wynika, że średnica wszystkich włókien węglowych tworzących włókninę (oznaczaną jako WP) waha się w szerokim zakresie (2-17µm). Włóknina ta składa się z porowatych włókien węglowych (W/Por) o średnicy w zakresie 7–17µm oraz gładkich włókien o średnicy 0,5–7µm. Rozkład średnic dla porowatej włókniny węglowej przedstawiono na RYS.3.



RYS.3. Rozkład wielkości średnic dla włókniny węglowej WP.

FIG.3. Diameter distribution for WP fabrics.

Przy zastosowaniu metody porozymetrii rtęciowej wyznaczano porowatość włókniny WP oraz włókien tworzących włókninę. Z badań wynika, że włóknina węglowa (WP) posiada dwa zakresy porowatości (RYS.4). Pierwszy z nich mieszczący się w granicach 20–250µm stanowią wolne przestrzenie pomiędzy włóknami. Drugi zakres porowatości związany jest z pojedynczymi włóknami. Średnice porów we włóknach mieszczą się w granicach 3nm-10µm. Taki rozkład wielkości porów może być korzystny w przypadku materiałów przeznaczonych na podłoża tkankowe. Dla porównania przedstawiono również wyniki badań wykonanych dla nieporowatej włókniny węglowej (RYS.5).



RYS.2. Mikrostruktura włókien tworzących włókninę (SEM). Widoczne włókienka o średnicy poniżej 2µm. FIG.2. Microscope image of carbon fabrics (SEM).

Fibers with diameter below 2µm.

The diameter of the fibres present in the WP fabrics, estimated using a Lanametr microscopy, varied from 2-17 μ m. This fabric made up mainly of porous carbon fibres with an average diameter 7-17 μ m was also composed of smooth, nonporous carbon fibres with a diameter 0,5–7 μ m. The diameter distribution of the WP fabrics is presented in FIG.3.

The porosity of the fabrics and fibres used to produce fabrics was determined by a mercury porosimeter. Our studies have shown that the WP carbon fabrics had two ranges of porosity (FIG.4). The pores of diameter $20-250\mu$ m were the result of the space between fibres, and the pores of diameter $3nm-10\mu$ m were related to W/Por fibres attributes. This kind of pore distribution may be promising in tissue engineering applications. The porosity results for nonporous carbon fabrics are shown in FIG.5.



RYS.4. Oznaczenie porowatości dla: (a) porowatej włókniny węglowej (WP), (b) włókien tworzących włókninę porowatą (W/Por). FIG.4. Porosity determination for: (a) WP (b) W/Por.



RYS.5. Oznaczenie porowatości dla włókniny węglowej WN. FIG.5. Porosity determination for WN fabrics.

Ocena cytotoksyczności włóknin węglowych

Po 24 godzinach hodowli w kontakcie z włókninami węglowymi WP i WN stwierdzono, że komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Liczba martwych komórek stanowiła 5% dla włókniny WP i 10% dla próbki WN. Ilość martwych komórek spadła po 72 godzinach hodowli do 2% w przypadku włókniny WN natomiast dla włókniny WP wynosiła 6%. We wszystkich hodowlach obserwowano dużą liczbę komórek w podziałach i ich prawidłową proliferację. Całkowita liczba komórek po 24 i 72 godzinach wzrosła w porównaniu do wyjściowej liczby komórek (RYS.6). Po 72 godzinnym kontakcie z włókninami również nie stwierdzono zmian morfologicznych (RYS.7), komórki utrzymują wrzecionowate, wydłużone kształty oraz przylegają do podłoży w postaci równomiernej warstwy.



RYS.6. Całkowita liczba komórek A549 po kontakcie z włókninami. FIG.6. Total number of A549 cell after 24 and 72 hours of contact with WP and WN implants.

The evaluation of cytotoxicity

After 24 hours all the cells that were cultured in contact with WP and WN samples were properly adhered to the bed and had proper morphological character. Dead cell number after 2 hours of contact with WP implants were at the level of 5% whereas in the case of WN the level was 10%. Dead cell number after 72 hours of contact with WN samples were at the level of 2% whereas in case of the WP sample the level was 6%. The proliferation of the cells in the presence of biomaterials was correct. The total number of cells after 24 and 72 hours culture with samples of WP and WN was higher than at the beginning of experiment.

The cytotoxicity test results indicate that direct contact of carbon fabrics with the human lung adenocarcinoma cells line A549 did not show any cytotoxicity effect (FIG.7). The cell culture was not influenced by the biomaterials and cells retained their elongated shape. No morphological cell changes were observed.



RYS.7. Badanie działania cytotoksycznego włóknin na linie komórek A549: (a) kontrola, (b) WP, (c) WN. FIG.7. The evaluation of the cytotoxicity. (a) control, (b) WP, (c) WN.

Wpływ średnicy włókien na odpowiedź komórkową w warunkach *in vivo*

Porównując wyniki doświadczeń związanych z implantacją do mięśnia szkieletowego szczura włóknin węglowych, różniących się między sobą średnicą włókien stwierdzono, że po 30 dniach od implantacji proces regeneracji tkanki w przypadku obu materiałów przebiega podobnie. Natomiast badania przeprowadzone po 210 dniach trwania doświadczenia wykazały różnice w zachowaniu się tkanki w kontakcie z badanymi próbkami (RYS.8). Zauważono, że włókna kolagenowe wokół włókniny węglowej o różnej średnicy włókien, wykazywały luźniejszy układ niż wokół typowej włókniny WN. Przy włóknach o mniejszej średnicy przez cały czas trwania eksperymentu obecna była torebka z tkanki łącznej. Wokół większych włókien, torebka zmniejszała swoją grubość, aż do całkowitego zaniku, pod koniec

The effect of the fibre diameter on cell response in vivo

All animals survived the surgery. No wound healing problems or complications were observed after the surgery and during the whole experiment. The inflammation response was observed around WP and WN implants as well. There were no evident differences between the WP and WN implants after 30 days. Differences in tissue responses to both materials were visible in subsequent series, especially after 210 days from the implantation (FIG.8). The structure of porous carbon fibres (W/Por) promotes tissue regeneration. The fibrous capsule around the smaller fibres was present during the entire experiment. With regard to fibres that were larger in diameter, there were many places where the carbon fibres were in direct contact with the muscle tissue. The results obtained in the *in vivo* study suggest the more

56



eksperymentu fragmenty włókien węglowych stykały się z tkanką mięśnia szkieletowego szczura. Z badań *in vivo* wynika, że włókna W/Por, dzięki swojej znacznej porowatości pozwalają na szybsze wnikanie elementów komórkowych i przerastanie tkanką łączną. Badania wykazały różny wpływ średnicy włókien węglowych na odpowiedź tkanki miękkiej.

Wnioski

Otrzymano włókninę zbudowaną z włókien o różnych średnicach i długości, której mikrostruktura posiada biomimetyczny charakter tzn. składa się z włókien o średnicach zbliżonych do średnic włókien występujących w tkankach (kolagen, włókna elastynowe). Włóknina ta posiada dwa zakresy porowatości. Pierwszy z nich stanowią wolne przestrzenie pomiędzy włóknami. Tworzą one układ otwartych porów, umożliwiający penetracje komórek w głąb materiału i odtworzenie tkanki w całej objętości implantu węglowego. Drugi zakres porowatości związany jest z pojedynczymi włóknami. Pory we włóknach powinny sprzyjać adhezji komórek do ich powierzchni, mogą stanowić również miejsca, które w przyszłości wypełnione zostaną substancjami (leki, białka) wpływającymi na metabolizm komórek. Badania in vitro wykazały, że otrzymane materiały są biozgodne, natomiast w oparciu o badania biologiczne in vivo wykazano, że odpowiedź tkanek na węgiel włóknisty zależy od średnicy włókien węglowych. Odpowiedź tkanek na włókna węglowe o średnicach poniżej 1µm jest różna w porównaniu z reakcją tkanek na włókna o średnicach przekraczających kilka mikrometrów. Analiza histologiczna jak i histochemiczna wykazała, że włókna o niskich średnicach są gorzej tolerowane przez tkanki.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007 - 2010 jako projekt badawczy POL-POST-DOC III NrPBZ/MNiSW/07/2006/53. RYS.8. Przekrój poprzeczny przez mięsień szkieletowy szczura w miejscu wszczepu włóknin węglowych po 210 dniach: (a) WN, (b) WP. Reakcja histochemiczna Van Giesona na obecność włókien kolagenowych.

FIG. 8. Collagen visualized by van Gieson's method in cross-sections of (a) WN and (b) WP implants after 210 days.

intense and quick regeneration of muscle tissue around the fibres with bigger diameter compared to the fibres with diameters below 2 micrometers. The studies prove that the influence on the connective tissues depends on the fibre diameter.

Conclusion

Based on the results of biological studies, a three dimensional fibrous biomaterial made from fibres differing in diameters and porosity, has been designed and prepared. This material will constitute a 3D scaffold containing fibrous components imitating the structure of natural tissues.

The prepared material contains two types of pores: 1) pores between fibres in which cells could penetrate, grow and proliferate to promote the formation of tissue and 2) pores in the fibre microstructure. Porous carbon fibres used as a scaffold for tissue regeneration could simultaneously serve as a support for the delivery of drugs or biologically active agents which would stimulate tissue growth.

The *in vitro* cytotoxicity tests revealed that the direct contact of the human lung adenocarcinoma cell line A549 with porous carbon fibres did not show any cytotoxicity effect. The *in vivo* study revealed that tissue response on carbon fibres strongly depends on their diameter. There is a different tissue reaction in the presence of carbon fibres with a diameter below 1 μ m compared to those with a diameter greater than a few micrometers.

Histological and histochemical analysis indicate that fibres with bigger diameters allow for more intense and quick regeneration of surrounding tissues.

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Higher Education, project POL -POSTDOC III no. PBZ/ MNISW/07/2006/53 (2007-2010).

Piśmiennictwo

[[1] K.Tuzlakoglu, S.Egri, M.E.Gomes, R.L.Reis "Nano- and Micro-fibre combined Scaffolds: A New Architecture for Bone Tissue Engineering" 19th European Coference on Biomaterials, September 11-15, 2005, Sorrento, Italy.

References

[2] I.Rajzer, E.Menaszek, M.Błażewicz, E.Zaczyńska "Biological evaluation of porous carbon fibres materials" 20th European Conference on Biomaterials, Nantes, 2006.

[3] I.Rajzer "Badania nad włóknistymi materiałami węglowymi przeznaczonymi na podłoża dla inżynierii tkankowej" Praca doktorska AGH 2006.

• • • • • • • • • • • • • • • •

AREOLOGIA NIEKONWENCJO-NALNEGO AZOTOWANIA JARZENIOWEGO STALI AUSTENITYCZNYCH (304 I 316L)

Tadeusz Frączek¹, Zbigniew Paszenda², Zygmunt Nitkiewicz¹, Monika Gwoździk¹, Marcin Basiaga²

¹ Politechnika Częstochowska, Wydział Inżynierii Procesowej, Materiałowej i Fizyki Stosowanej, Instytut Inżynierii Materiałowej ² Politechnika Śląska, Wydział Mechaniczno-Technologiczny, Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych e-mail: fraczek@mim.pcz.czest.pl

Streszczenie

W pracy dokonano oceny wpływu azotowania jarzeniowego na własności warstwy wierzchniej stali austenitycznej gatunku 304 i 316L. Proces azotowania jarzeniowego przeprowadzono w urządzeniu do azotowania typu JON-600. Azotowanie przeprowadzono w temperaturze 733 K (460°C), przy ciśnieniu p=150 Pa i w czasie t = 64,8 ks (18 h). Do realizacji procesu azotowania zastosowano atmosferę reaktywną składającą się z mieszaniny 25% azotu, 75% wodoru (natężenie przepływu 250ml/min N₂+750ml/minH₂).

[Inżynieria Biomateriałów, 67-68, (2007), 57-59]

Wstęp

Areologia jest obszarem wiedzy podstawowej i stosowanej, którego głównym zadaniem jest badanie zjawisk zachodzących na powierzchni ciał stałych, w celu zwiększenia trwałości eksploatacyjnych warstw powierzchniowych wyrobów [1].

Materiały konstrukcyjne stosowane w medycynie oraz w budowie elementów maszyn, aparatów i armatury dla przemysłu spożywczego, spełniać muszą bardzo wysokie wymagania sanitarno-higieniczne przy jednoczesnym spełnieniu wysokich wymogów wytrzymałościowych i fizycznych [2].

Stosowane najczęściej w tych dziedzinach grupy stali austenitycznych: 18-8 oraz 17-14-2L, posiadają zbliżone własności wytrzymałościowe, natomiast odporność korozyjna stali 17-14-2L jest wyższa, ze względu na większą zawartość niklu oraz 2 % dodatek molibdenu [2]. Mankamentem stosowania stali z grupy 17-14-2L jest jednakże to, że elementy z niej wykonane są znacznie droższe od stali typu 18-8.

Alternatywnym rozwiązaniem może być modyfikacja warstw wierzchnich relatywnie tanich stali austenitycznych z grupy 18-8, powodująca zwiększenie trwałości eksploatacyjnej tych stali.

Coraz większe wymagania stawiane technologom i konstruktorom odnośnie uszlachetniania materiałów sprawiły, że preferowane są te z metod obróbki cieplnej i powierzchniowej, które oprócz poprawy trwałości eksploatacyjnej i małych kosztów eksploatacyjnych są metodami o niskiej energochłonności i dużej "czystości" z ekologicznego punktu widzenia [3,4]. Jedną z metod polepszenia własności warstw wierzchnich materiałów jest azotowanie.

Azotowanie stali wysokochromowych, jest często stosowanym zabiegiem mającym na celu podniesienie odporności

AREOLOGY OF UNCONVENTIONAL PLASMA NITRIDING OF AUSTENITIC STEELS (304 AND 316L)

Tadeusz Frączek¹, Zbigniew Paszenda², Zygmunt Nitkiewicz¹, Monika Gwoździk¹, Marcin Basiaga²

¹ Czestochowa University of Technology, Faculty of Process and Material Engineering and Applied Physics, Institute of Material Engineering ² Silesian University of Technology, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Engineering Materials and Biomaterials E-mail: fraczek@mim.pcz.czest.pl

Abstract

The influence of plasma nitriding on properties of surface layer of 304 and 316L austenitic steels was evaluated in this paper. The process of plasma nitriding was carried out in a JON-600 nitriding installation. The nitriding was performed at 733 K (460°C) at pressure p=150 Pa and during 64.8 ks (18 h). A reactive atmosphere consisting of a mixture of 25% of nitrogen and 75% of hydrogen (rate of flow 250ml/min N_2 + 750 ml/min H_2) was used to carry out the nitriding.

[Engineering of Biomaterials, 67-68, (2007), 57-59]

Introduction

Areology is the area of basic and applied science, which main task consists of studying phenomena occurring on solids surface, to increase operational life of products surface layers [1].

Construction materials used in medicine and in construction of components of machines, instruments and fittings for the food industry must meet very strict sanitary – hygienic requirements parallel to meeting high strength requirements [2].

Groups of 18-8 and 17-14-2L austenitic steels used most often in those areas have similar mechanical properties, while the corrosion resistance of 17-14-2L steel is higher due to higher nickel content and 2% addition of molybdenum [2]. However, the drawback of using steels from 17-14-2L group is the fact that components made of them are much more expensive than of 18-8 type steel.

Modification of surface layers of relatively cheap austenitic steels from group 18-8, causing increased operational life of those steels may be an alternative solution.

Increasingly high requirements set to process and design engineers in relation to materials refinement made that such thermal and surface treatment methods are preferred, which apart from improvement in operational life and low operational costs are methods of low energy consumption and high "cleanness" from environmental point of view [3,4]. Nitriding is one of methods used to improve properties of materials surface layers.

Nitriding of high-chromium steels is a frequently used treatment aimed at increasing those steels wear resistance. However, this process encounters numerous difficulties due to the existence of a tight layer of chromium oxides on their surface, which make the diffusion of nitrogen more difficult. In practice this difficulty is eliminated through surface pretreatments such as etching and phosphatising, or through introduction to the reactive chamber of such additions as 57

BI MATERIALS

na zużycie tych stali. Proces ten napotyka jednak wiele trudności ze względu na istnienie na ich powierzchni szczelnej warstewki tlenków chromu, które utrudniają dyfuzję azotu. W praktyce trudność ta jest eliminowana na drodze wstępnej obróbki powierzchniowej takiej jak trawienie i fosforanowanie, bądź przez wprowadzenie do komory reakcyjnej dodatków takich jak chlorek amonu lub HCI, czy w końcu przez stosowanie takich kosztownych obróbek jak obróbki jarzeniowe czy plazmowe [5].

Azotowanie gazowe stali austenitycznych jest ważną obróbką powierzchniową podnoszącą twardość i odporność na ścieranie, co znacznie rozszerza jej zastosowanie jako materiału konstrukcyjnego. Niestety obróbka ta przeprowadzana w temperaturze powyżej 500°C powoduje wytworzenie azotków chromu i/lub żelaza co wpływa na pogorszenie odporności korozyjnej [6].

W Instytucie Inżynierii Materiałowej Politechniki Częstochowskiej podjęto próbę modyfikacji powierzchni stali austenitycznych poprzez azotowanie jarzeniowe w celu poprawy odporności na zużycie i korozję. Niniejsze opracowanie dotyczy badań warstw wierzchnich uzyskiwanych na wytypowanych do badań stalach austenitycznych.

Materiał i metodyka badań

Procesom azotowania jarzeniowego poddano wytypowane do badań z grupy stali austenitycznych 18-8 i 17-14-2L stale 304 i 316L wg. ASTM.

Proces azotowania przeprowadzono w urządzeniu do obróbek jarzeniowych z chłodzoną anodą typu JON-600, stosując cztery warianty azotowania:

1. wariant I - próbki umieszczono na katodzie,

2. wariant II - próbki umieszczono na powierzchni odizolowanej przy pomocy labiryntu ceramicznego zarówno od katody jak i anody, czyli w tzw. "potencjale plazmy",

3. wariant III - próbki umieszczone na katodzie zostały przykryte ekranem wspomagającym, wykonanym z perforowanej blachy tytanowej,

4. wariant IV - próbki umieszczone w potencjale plazmy zostały przykryte ekranem wspomagającym jak w przypadku wariantu powyżej.

W pierwszym przypadku powierzchnia próbek bombardowana jest jonami o energiach wynikających z wartości spadku katodowego (około 800V) natomiast do podłoży odizolowanych od katody i anody docierające jony mają niewielką energię, ponieważ posiadają ujemną polaryzację względem plazmy rzędu 20V, tak więc nie występuje w tym przypadku efekt rozpylania [7,8]. W dwóch pozostałych wariantach następuje zintensyfikowanie procesów powierzchniowych w wyniku powstawania na perforowanych ekranach katod wnękowych, co powoduje wzrost temperatury azotowanych próbek.

Pomiary twardości powierzchniowej oraz rozkłady mikrotwardości warstw azotowanych wykonano metodą Knoppa na mikrotwardościomierzu firmy Future Tech. Corporation FM7 przy obciążeniu 100G (980,7mN).

Badania trybologiczne w warunkach tarcia suchego przeprowadzono na testerze typu T-05 o układzie par trących rolka–klocek.

Wyniki badań

Azotowanie jarzeniowe dla każdego z zastosowanych wariantów powoduje, przy przyjętych parametrach procesu, wzrost twardości powierzchniowej w przypadku wytypowanych do badań stali austenitycznych. Najmniejszy blisko 3-krotny wzrost twardości wystąpił w przypadku azotowania w tzw. "potencjale plazmy" wyładowania jarzeniowego prądu stałego.

ammonium chloride or HCl, or finally by the use of such costly treatments like ion or plasma treatments [5].

The ammonia nitriding of austenitic steels is an important surface treatment, increasing the hardness and abrasion resistance, what substantially expands their application as a construction material. Unfortunately this treatment carried out above 500°C causes creation of chromium and/or iron nitrides, resulting in deterioration of corrosion resistance [6].

At the Institute of Material Engineering of Czestochowa University of Technology an attempt was made to modify the surface of austenitic steels via plasma nitriding to improve the wear and corrosion resistance. This paper refers to surface layers obtained on austenitic steels selected for tests.

Material and methodology of tests

304 and 316L steels, acc. to ASTM, selected for tests from the group of 18-8 and 17-14-2L austenitic steels, were subject to plasma nitriding.

The process of nitriding was carried out in a water-cooled JON-600 installation for ion treatments, using four nitriding variants: 1. variant I – specimens were located on the cathode,

2. variant II – specimens were located on a surface insulated, by means of ceramic maze, both from the cathode and anode, i.e. at so-called "plasma potential",

 variant III – specimens located on the cathode were covered with an assisting screen, made of perforated titanium sheet,
 variant IV – specimens placed at plasma potential were covered with an assisting screen, like in the above variant.

In the first case the surface of specimens is bombarded with ions of energies resulting from the cathode fall (approx. 800V), while ions reaching substrates insulated from the cathode and anode have a low energy, because they have negative bias of around 20V against plasma, so in this case the effect of sputtering does not occur [7,8]. In the other two variants the surface processes are intensified as a result of hollow cathodes originating on perforated screens, what results in increase of nitrided specimens temperature.

Measurements of surface hardness as well as of distributions of nitrided layers microhardness were performed using the Knopp method on an FM7 Future Tech. Corporation microhardness tester at the load of 100G (980.7mN).

Tribological tests in conditions of dry friction were carried out on a T-05 tester with an arrangement of roller–block rubbing pairs.

Results of examinations

For all the variants the plasma nitriding results in, at assumed process parameters, an increase in the surface hardness in the case of austenitic steels selected for tests. The lowest, nearly 3-times, hardness increase occurred in the case of nitriding at so-called "plasma potential" of d.c. glow discharge. The highest (around 7-times) increase in the surface hardness occurred in the case of nitriding acc. to variant III; slightly lower values of surface hardness were obtained in the case of conventional plasma nitriding on the cathode. It should be mentioned that nitriding at so-called "plasma potential" using an assisting screen causes also a high, because around 6-times, increase in the surface hardness (FIG.1).

Plasma nitriding of tested steel results in an increase in resistance to abrasive wear as against the initial state. The highest, around 20-times increase in resistance to abrasive wear occurred in the case of nitriding on the cathode using an assisting screen, what was probably caused by the existence on the surface layer of tested steel of nitrides, in particular high-chromium Cr_2N type nitrides, as well as by a thicker nitrides layer (FIG.2).



RYS.1.Twardość powierzchniowa azotowanych jarzeniowo stali austenitycznych; P–plazma, P+E–plazma +ekran wspomagający, K–katoda, K+E–katoda+ekran.

FIG.1. Surface hardness of plasma nitrided austenitic steels; P–plasma, P+E–plasma+assisting screen, K -cathode, K+E–cathode+assisting screen.

Największy (około 7-krotny) wzrost twardości powierzchniowej wystąpił w przypadku azotowania według wariantu III, Nieco niższe wartości twardości powierzchniowej uzyskano w przypadku konwencjonalnego azotowania jarzeniowego na katodzie. Nadmienić należy, że azotowanie w tzw. "potencjale plazmy" z zastosowaniem ekranu wspomagającego powoduje również wysoki bo około 6-krotny wzrost twardości powierzchniowej (RYS.1).

Azotowanie jarzeniowe badanych stali powoduje wzrost odporności na zużycie ścierne w stosunku do stanu wyjściowego. Największy, około 20-krotny wzrost na zużycie ścierne wystąpił w przypadku azotowania na katodzie z zastosowaniem ekranu wspomagającego, jest to spowodowane prawdopodobnie obecnością w warstwie wierzchniej badanej stali azotków, a zwłaszcza azotków wysokochromowych typu Cr₂N, jak również grubszą strefą azotków (RYS.2).

Podsumowanie

Procesy azotowania jarzeniowego spowodowały znaczny wzrost twardości powierzchniowej wytypowanych do badań stali austenitycznych gatunku 304 i 316L. Największy wzrost twardości powierzchniowej wystąpił dla wariantów z zastosowanymi dodatkowo ekranami wspomagającymi proces azotowania jak również w przypadku azotowania katodowego.

Podobne zależności wystąpiły w przypadku badań odporności na zużycie ścierne naazotowanych jarzeniowo stali austenitycznych z zastosowaniem ekranów wspomagających.

Analizując, uzyskane wartości twardości powierzchniowej oraz odporności na zużycie ścierne w odniesieniu do badanych gatunków stali austenitycznych tj. 304 i 316L, należy stwierdzić, że dla poszczególnych wariantów azotowania są one porównywalne, co jest wydaje się być korzystnym z ekonomicznego punktu widzenia.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego PW-004/ITE/02/2005.



RYS.2. Wyniki badań odporności na zużycie stali austenitycznych po azotowaniu jarzeniowym. FIG. 2. Results of tests on resistance to wear of plasma nitrided austenitic steels.

Summary

Plasma nitriding processes caused a substantial increase in the surface hardness of 304 and 316L austenitic steels chosen for testing. The highest increase in surface hardness occurred for variants with additionally applied screens assisting the nitriding as well as in the case of cathode nitriding.

Similar relationships occurred in the case of tests on resistance to abrasive wear of plasma nitrided austenitic steels with the use of assisting screens.

While analysing the obtained values of surface hardness and of resistance to abrasive wear with regard to tested austenitic steel grades, i.e. 304 and 316L, it should be stated that individual nitriding variants are comparable, what seems favourable from economic point of view.

Acknowledgements

The studies were financially supported by project No PW-004/ITE/02/2005.

Piśmiennictwo

.....

References

 Burakowski T.: Możliwości areologii (Possibilities of areology). Inżynieria Materiałowa (Material Engineering), 2006, No 5, p. 890-897
 Pałka K., Weroński A.; Chromowanie dyfuzyjne stali austenitycznych w budowie maszyn spożywczych (Chromium impregnation of austenitic steels in construction of machinery for the food industry). Inżynieria Materiałowa (Material Engineering), 2003, No 6, p. 537-538

[3] Burakowski T., Sala A.: Racjonalizacja zużycia energii w obróbce cieplnej metali (Rationalisation of energy consumption in the thermal treatment of metals). Wydawnictwo IMP (IMP Publishers). Warsaw. 1980

[4] Sala A.: Zmniejszenie energochłonności (Reduction of the energy consumption). Wydawnictwo MCNEMT (Publishers). 1993

[5] Baranowska J., Szczeciński K., Wysiecki M.; Azotowanie stali wysokochromowych (Nitriding of high-chromium steels). Inżynieria Materiałowa (Material Engineering), 1999, No 5, p. 279-281. Inżynieria Materiałowa (Material Engineering), 2005, No 5, p. 448-451

[6] Baranowska J.; Mikrostruktura warstw azotowanych na stali austenitycznej (Microstructure of nitrided layers on an austenitic steel) [7] Michalski J.: Journal of Materials Science Letters, 19, (2000), 1411-1414.

[8] Frączek T, Michalski J.: Rola potencjału plazmy w warunkach wyładowania jarzeniowego prądu stałego w procesie azotowania stali EJ96 (The role of plasma potential in conditions of d.c. glow discharge in the process of EJ96 steel nitriding), Inżynieria Materiałowa (Material Engineering), (2002), (No 5), 299-301.

BI MATERIALS

Wskazówki dla autorów

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

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane. Prosimy Autorów nadsyłanych prac o dołączenie oświadczenia, że artykuł jest oryginalny, a treści w nim zawarte są zgodne z prawem autorskim o własności intelektualnej i przemysłowej, a także, że nie był wcześniej publikowany w innych czasopismach krajowych i zagranicznych oraz w materiałach konferencyjnych.

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres redakcji na płytach CD wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

4. Struktura artykułu:

- TYTUŁ
- Autorzy
- Streszczenie (100-200 słów)
- Słowa kluczowe (4-6)
- Wprowadzenie
- · Materiały i metody
- · Wyniki i dyskusja
- Wnioski
- Podziękowania
- Piśmiennictwo

5. Należy podać pełne imię i nazwisko wszystkich autorów artykułu. Jeśli autorzy pochodzą z różnych instytucji przy nazwisku należy wstawić odpowiedni odnośnik w indeksie górnym. Poniżej należy podać dokładne nazwy instytucji i pełne adresy pocztowe dla każdego autora (Imię Nazwisko¹, Imię Nazwisko², ...).

6. Manuskrypt powinien być napisany czcionką Arial 9 z podwójnymi odstępami między wierszami. Obowiązuje układ jednostek SI.

7. Materiały ilustracyjne (rysunki, wykresy, schematy, tabele, fotografie) powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Pożądane jest, aby mieściły się w szerokości szpalty lub kolumny (podstawa 8 cm lub 17 cm). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel.

W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie np.:

Instructions for authors

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

2. All articles are reviewed. The authors should enclose a statement, that the article is original, has not been published previously and is not under consideration for publication elsewhere.

3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office on CD with a printout, drawings and photos.

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

- TITLE
- Authors and affiliations
- Abstract (100-200 words)
- Keywords (4-6)
- Introduction
- Materials and methods
- Results and Discussions
- Conclusions
- Acknowledgements
- References

5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts ^{1.2}.
6. The papers should be written in MS-WORD using Arial 9 point size font with a double line spacing. SI units should be used.

7. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

8. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. References should contain the authors' names and initials, full title of the paper, name of the journal (full or using Journal Abbreviations Index), year of publication, volume number, first and last page numbers.

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

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

Właściwości / Properties	Kość korowa / Cortical bone	Kość gąbczasta / Cancellous bone
Moduł Younga / Young's modulus (GPa)	14-20	0,05-0,5
Wytrzymałość na rozciąganie / Tensile strength (MPa)	50-150	10-20
Wytrzymałość na ściskanie / Compressive strength (MPa)	170-193	7-10
Odporność na kruche pękanie / Fracture toughness (MPa m ^{1/2})	2-12	0,1
Gęstość / Density (g/cm ³)	18-22	0,1-1,0

W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).

Rys. 1. Zdjęcia SEM badanych materiałów. Fig. 1. SEM micrographs of investigated materials.

Rys. 2. Przeżywalność fibroblastów i osteoblastów w kontakcie z badanym materiałem.

Fig. 2. Viability of fibroblasts and osteoblasts in contact with investigated material.

8. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany. Numer cytowanej pozycji w tekście należy umieszczać w nawiasie kwadratowym, np. [1], [2-4], [1, 3-6]. W wykazie literatury należy podać podstawowe elementy opisu bibliograficznego (nazwiska autorów i skróty ich imion, tytuł artykułu, tytuł czasopisma, tom, rok, strony).



11. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.

Należy podawać pełne tytuły czasopism lub stosować ich skróty zgodnie z obowiązującymi normami np. ISI Journal Abbreviations Index.

9. Wzory matematyczne i chemiczne powinny być pisane bardzo czytelnie, a ich kolejność należy zaznaczyć po prawej stronie numerami w nawiasach okrągłych, np. ... (3).

10. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, niezbędnych skrótów, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, gramatycznych w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.

11. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.

12. W celu łatwego i szybkiego kontaktu z Autorem pracy prosimy każdorazowo podawać dokładny adres do korespondencji wraz z numerem telefonu, faxu i adresu e-mailowego. Jest to szczególnie ważne w przypadku pracy zespołowej, której autorzy pracują w różnych instytucjach.

 Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
 Artykuł, w którym nie uwzględniono podanych wskazówek, zostanie odesłany Autorom do poprawy przed przystąpieniem do recenzji merytorycznej.
 Adres redakcji:

Czasopismo

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów al. Mickiewicza 30 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38, 617 22 39 fax (48 12) 617 33 71 e-mail: chlopek@agh.edu.pl www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl

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

Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

Piśmiennictwo

References

 Marciniak J.: Biomateriały w chirurgii kostnej, wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 1992.

[2] Chłopek J., Kmita G.: The study of lifetime of polymer and composite bone joint screws under cyclical loads and in vitro conditions. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 16 (2005) 1051-1060.

[3] Dunne N.J., Daly C., Beverland D.E., Carey G., Orr J.F.: Mixing of acrylic bone cement-current theatre practices. Proceedings of the 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia (2004) 1465.

ISI Journal Abbreviations Index / Wykaz skrótów nazw czasopism wg ISI. http://www.efm.leeds.ac.uk/%7Emark/ISIabbr

Journal Titles and Abbreviations http://www.library.ubc.ca/scieng/coden.html

Nazwy 8.500 czasopism biomedycznych i ich skróty w układzie alfabetycznym / Names and abbreviations of 8.500 biomedical journals in alphabetic order http://www.bibl.amwaw.edu.pl/LPJ/jour_a_c.htm

12. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics Department of Biomaterials 30, Mickiewicz Ave. 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38, 617 22 39 fax (48 12) 617 33 71 e-mail: chlopek@agh.edu.pl www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates: Cost of one number: 20 PLN

Payment should be made to: Polish Society for Biomaterials AI. Mickiewicza 30/A-3 30-059 Krakow, Poland Bank Slaski S.A. O/Krakow account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

BI MATERING OF