BI MATERIAŁÓW

ENGINEERING OF BIOMATERIALS CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW

.............

Numer 7, 8 Rok II ISSN 1429-7248

CZERWIEC, WRZESIEŃ 1999

WYDAWCA:

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

KOMITET REDAKCYJNY:

Redaktor naczelny Stanisław Błażewicz Sekretarz redakcji, Skład komputerowy Augustyn Powroźnik Redaktorzy Elżbieta Godlewska Cezary Wajler

RADA NAUKOWA:

Jan Ryszard Dabrowski Politechnika Białostocka Monika Gierzyńska-Dolna Politechnika Częstochowska Andrzej Górecki Akademia Medyczna Warszawa Woiciech Maria Kuś Akademia Medyczna Warszawa **Jan Marciniak** Politechnika Śląska Stanisław Mazurkiewicz Politechnika Krakowska **Roman Pampuch** Akademia Górniczo-Hutnicza Bogna Pogorzelska-Stronczak Śląska Akademia Medyczna

ADRES REDAKCJI:

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



BI MATERIAŁÓW

16

21

26

SPIS TREŚCI

PROTEIN ADSORPTION, CELL ADHESION AND POLYMER SURFACES: MOLECULAR PROCESSES AND EXPERIMENTAL METHODS 4

P.G. ROUXHET, J.L. DEWEZ, TH. MARCHAL, CH. DUPONT-GILLAIN, Y. DUFRENE

VARIOUS REINFORCEMENTS OF THE C/C COMPOSITE BONE PLATES AND THEIR INFLUENCE ON MECHANICAL PROPERTIES 8

Karel Balík, Miroslav Sochor, Josef Křena, Bohuslav Cabrnoch, Petr Glogar, Iloslav Vilímek, Vlasta Pešáková

ENKAPSULACJA KOMÓREK W CELU OTRZYMANIA HYBRYDOWYCH SZTUCZNYCH NARZĄDÓW 11

M. Kozicki, P. Kujawa, L. Pajewski, M. Kołodziejczyk, J. Narębski, J. M. Rosiak

TRYBOLOGICZNE ZUŻYCIE POLIETYLENU UHMWPER

SCHULTE, B.CLEFF, A. PAWELEC, J. OTFINOWSKI, B.FRAŃCZUK, M. LEKKA, J. LEKKI, Z. STACHURA

OCENA WPŁYWU ELEKTROSTYMULACJI ZROSTU KOSTNEGO NA PROCES KOROZJI IMPLANTÓW ZE STALI Cr-Ni-Mo

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

ELEKTROCHEMICZNE I KOROZYJNE WŁAŚCIWOŚCI TI6AL4V ELI W ROZTWORACH KWASU FOSFOROWEGO

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

CONTENTS

PROTEIN ADSORPTION, CELL ADHESION AND POLYMER SURFACES: MOLECULAR PROCESSES AND EXPERIMENTAL METHODS 4

P.G. ROUXHET, J.L. DEWEZ, TH. MARCHAL, CH. DUPONT-GILLAIN, Y. DUFRENE

VARIOUS REINFORCEMENTS OF THE C/C COMPOSITE BONE PLATES AND THEIR INFLUENCE ON MECHANICAL PROPERTIES 8

Karel Balík, Miroslav Sochor, Josef Křena, Bohuslav Cabrnoch, Petr Glogar, Iloslav Vilímek, Vlasta Pešáková

ENCAPSULATION OF LIVING CELLS TOWARDS ARTIFICIAL, HYBRID ORGANS 11

M. Kozicki, P. Kujawa, L. Pajewski, M. Kołodziejczyk, J. Narębski, J. M. Rosiak

UHMWPE WEAR BY TRIBOLOGICAL LOAD 16

R. Schulte, B.Cleff, A. Pawelec, J. Otfinowski, B.Frańczuk, M. Lekka, J. Lekki, Z. Stachura

EVALUATION OF INFLUENCE OF THE BONE UNION ELECTROSTIMULATION ON CORRO-SION PROCESS OF THE IMPLANTS MADE OF Cr-Ni-Mo STEEL

21

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

ELECTROCHEMICAL AND CORROSION PROPERTIES OF TIGAL4V ELI IN PHOSPHORIC ACID SOLUTIONS 26

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

BADANIA WYTRZYMAŁOŚCIOWE I MIKROSKOPOWE MINIPŁYTEK STOSOWA-NYCH W LECZENIU ZŁAMAŃ KOŚCI ŻUCHWY 32

MILEWSKI G., DZIADUR W.

BADANIA KOMPOZYTU WEGLOWEGO W MIKROSKOPIE SKANINGOWYM PO WSZCZEPIENIU DO TKANKI KOSTNEJ ZWIERZAT

GRZEGORZ BAJOR, ZBIGNIEW PASZENDA. JANUSZ BOHOSIEWICZ, JAN MARCINIAK

PROTEZA KOŃCZYNY MIEDNICZNEJ **U PSA-OPIS PRZYPADKU**

JACEK STERNA

BADANIE WPŁYWU MATRIAŁÓW HEMOSTATYCZNYCH NA PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZE

MARIA SZYMONOWICZ, JAKUB KRATOCHWIL, ROMAN RUTOWSKI, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ, DANUTA PALUCH, LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

BADANIA BIOLOGICZNE WŁÓKIEN Z DIBUTYRYLOCHITYNY

DANUTA PALUCH, LIDIA SZOSLAND, JERZY KOŁODZIEJ, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ, MARIA SZYMONOWICZ, LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

KRAJOWE PROCEDURY NORMALIZACYJNE DOTYCZĄCE BIOMATERIAŁÓW NA PRZYKŁADZIE NORMY ISO-10993: **BIOLOGICZNA OCENA WYROBÓW** MEDYCZNYCH

LESZEK SOLSKI, DANUTA PALUCH, LESZEK KRZYWOSIŃSKI

WARSTWY DIAMENTOWE NA IMPLANTACH **DLA TRAUMATOLOGII**

S. MITURA, J. MARCINIAK, P. NIEDZIELSKI, Z. PASZENDA

STRENGTH AND MICROSCOPIC EXAMINATION **OF MINIPLATES APPLIED IN TREATMENT OF MANDIBULAR FRACTURES**

MILEWSKI G., DZIADUR W.

SEM EXAMINATION OF CARBON **COMPOSITE IMPLANTED INTO THE** ANIMALS BONE TISSUE

GRZEGORZ BAJOR, ZBIGNIEW PASZENDA, JANUSZ BOHOSIEWICZ, JAN MARCINIAK

PROSTHESIS OF THE PELVIC LIMB IN THE DOG- CASE REPORT

JACEK STERNA

37

44

45

52

60

65

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF TOPICAL HAEMOSTATIC MATERIALS ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS PARAMETER'S 45

MARIA SZYMONOWICZ, JAKUB KRATOCHWIL, ROMAN RUTOWSKI, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ. DANUTA PALUCH, LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

A BIOLOGICAL INVESTIGATION OF **DIBUTYRYLCHITIN FIBRES**

DANUTA PALUCH, LIDIA SZOSLAND, JERZY KOŁODZIEJ, JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ, MARIA SZYMONOWICZ, LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

POLISH STANDARISATION PROCEDURES **RELATED TO BIOMATERIALS ON THE** PARTICULAR EXAMPLE OF ISO-10993: **BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES**

60

65

52

LESZEK SOLSKI, DANUTA PALUCH, LESZEK KRZYWOSIŃSKI

DIAMOND-COATED IMPLANTS FOR TRAUMATOLOGY

S. MITURA, J. MARCINIAK, P. NIEDZIELSKI, Z. PASZENDA

32

37

44

MATERIAŁC

PROTEIN ADSORPTION, CELL ADHESION AND POLYMER SURFACES: MOLECULAR PROCESSES AND EXPERIMENTAL METHODS

P.G. ROUXHET, J.L. DEWEZ, TH. MARCHAL, CH. DUPONT-GILLAIN, Y. DUFRENE

UNITÉ DE CHIMIE DES INTERFACES, UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, LOUVAIN-LA-NEUVE, BELGIUM

Abstract

Adsorption of extracellular matrix (ECM) proteins in competition with other substances is a key to explain the relationship between substratum surface hydrophobicity and mammalian cell adhesion: when polystyrene substrata were exposed simultaneously to ECM protein and a PEO-PPO-PEO polymer surfactant (Pluronic F68), either by pre-conditioning or through protein cell secretion, a weaker substratum hydrophobicity favoured adsorption of the protein and subsequent cell adhesion. This knowledge was used to achieve a selective adhesion of different types of mammalian cells on tracks (a few tens of μm wide) produced on polystyrene by photolithography and oxygen plasma treatment, conditioning the substratum with a solution of ECM protein and Pluronic F68.

Examination of a broader range of substrata confirmed that inhibition of cell adhesion on hydrophobic substrata is due to adsorption of substances competing with extracellular matrix proteins. However it also showed that substratum surface properties more subtle than overall wettability are important.

In situ observation of the nanoscale organisation of collagen adsorbed in the absence of competitor, using atomic force microscopy (AFM), showed that a smooth substratum surface allows collagen mobility and aggregation of molecular ends in the adsorbed phase. The organisation obtained after drying (smooth film, pattern) was examined by combining AFM, XPS and radiolabelling and found to be influenced by substratum roughness, substratum hydrophobicity and drying rate.

Key words: protein adsorption, cell adhesion, polymers, surface patterns, atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), radiolabelling, nanotechnology.

Introduction

I MATERIALOW

Better understanding of the interaction between mammalian cells and material surfaces is essential in biomaterial engineering, whether the aim is to achieve a particular cell behaviour (in terms of proliferation, migration, physiology, architecture, organisation) or to minimise any influence of the surface on the biological system (passive biocompatibility). This contribution is a summary of recent work focused on the influence of polymer surface properties on protein adsorption and on mammalian cell adhesion. Exciting new possibilities offered by atomic force microscopy to probe, in situ, the organisation of adsorbed proteins are described. More extensive literature review and experimental details can be found in cited references.

Competitive adsorption of proteins: key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of mammalian cells

The adsorption of type I collagen was investigated in using polystyrene substrata characterised by different ongen surface concentrations and wetting properties. backriological grade dishes BGPS-S and BGPS-F, and taske culture dishes TCPS, with O/C atomic concentration ratios determined by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) < 0.001, about 0.02 and about 0.20, and water contact angles equal to 97°, about 82° and about 56°, respectively. The adsorption was performed in PBS buffer at pH 7.2 and ionic strength 0.165 M and quantified using labelled collagen and radiocounting, on the one hand, and XPS, on the other hand.

The adsorption of collagen solution in PBS is only slightly affected by the surface properties of the supports. The adsorption isotherms show that collagen has a higher affinity with the more hydrophobic substratum and reaches a plateau of 0.7 μ gcm⁻² for a residual concentration of 20 μ gm⁻¹ With TCPS, no plateau is observed. However the amount adsorbed for a residual concentration of about 30 μ g m⁻¹ is similar for the three substrata.

Strong changes occur when adsorption takes place from a solution of collagen containing Pluronic F68. This is a poly(ethylene oxide) - poly(propylene oxide) - poly(ethylene oxide) triblock copolymer surfactant (PEO₈₀ - PPO₃₀ - PEO₈₀) which is frequently added in serum-free media. A drastic decrease of collagen adsorption is observed for BGPS while, for TCPS, the amount adsorbed decreases more progressively as a function of Pluronic F68 concentration. This is revealed both by radiocounting and by XPS, as illustrated by FIGURE1. A similar trend is observed when the compounds competing with collagen for adsorption are human serum albumin or constituents of fetal calf serum.

This observation explains the adhesion behaviour of human hepatoblastoma cell line, Hep G2, cultured in chemically defined nutritive medium [2]. The substrata were BGPS-F and TCPS conditioned by collagen and rinsed with PBS. When the substratum was pre-conditioned with a collagen solution in PBS, the cells attached and spread both on TCPS and BGPS. When Pluronic F68 was present in the conditioning solution, either brought by a commercial medium or added in the laboratory, attachment and adhesion took place on TCPS and not on BGPS. It turns out that the effect of substratum hydrophobicity on Hep G2 cell adhesion is mediated by the adsorption competition between an extra-cellular matrix (ECM) protein and another compound, collagen and Pluronic F68 respectively in the present case.



FIG.1. Adsorption of collagen on TCPS (black), BGPS-F (white) and BGPS-S (dotted) substrata in the presence of the indicated initial concentrations of Pluronic F68. A, amount adsorbed determined by radiolabelling; B, mole fraction of nitrogen determined by XPS. Initial collagen concentration = $30 \,\mu$ gml⁻¹; adsorption time = 1 h; T = 36° C; pH 7.2; I = $165 \,\text{mM}$.

Competitive adsorption also explains the influence of substratum hydrophobicity on Hep G2 cell attachment and spreading in the presence of Pluronic F68 when the substratum is not pre-conditioned, the cell response depending on the production of proteins by the cells themselves [3]. On strongly hydrophobic polystyrene substrata, adhesion was hindered in the presence of the surfactant, which prevented the adsorption of secreted proteins. Cell adhesion on substrata pre-conditioned with a solution of ECM proteins (collagen, laminin, fibronectin) was not hindered by Pluronic F68 present in the culture medium, indicating that pre-adsorbed proteins were not markedly displaced by the surfactant. This was found whatever the substratum surface hydrophobicity, whether protein synthesis was going on or switched off. When the substratum was pre-conditioned with fetal calf serum (1 %), the effect of ECM proteins of the serum dominated with respect to the effect of albumin; the cells attached and spread.

Application to selective cell adhesion on defined patterns

Understanding the influence of substratum surface hydrophobicity on cell adhesion was applied to achieve adhesion following defined patterns [4,5]. The procedure involved the following steps :

a photosensitive resin is spin-coated on a polystyrene substratum;

- it is submitted to UV irradiation through a mask grooved with tracks (width of the order of tens of mm);

- the irradiated resin is dissolved (development);

 the system is treated by an oxygen radio-frequency plasma discharge;

- the remaining resin is dissolved;

 the substrate is conditioned with a solution of a ECM protein and Pluronic F68;

- cells are inoculated.

FIGURE 2A shows an image of the material processed by photolithography and oxygen plasma treatment. The image was obtained by atomic force microscopy (AFM) in the lateral force mode. The contrast is created by the friction of

the AFM tip, which is weaker on the oxidised tracks (PSox) compared to polystyrene (PS). The water contact angle measured on wide zones of PS and PSox is 86° and 52°, respectively. FIGURE 2B shows a ToF-SIMS image of the material conditioned with a solution of fibronectin (33 mg ml⁻¹) and Pluronic F68 (150 µg ml⁻¹). The image was made using CNO⁻ ions, which are specific to the protein. It shows that fibronectin adsorbs selectively on the oxidised tracks. FIGURE 2C gives an optical micrograph of MSC mouse schwannoma adhering on the pre-conditioned substratum. This demonstrates that cells adhere selectively on the oxidised tracks thanks to the selective preadsorption of fibronectin. Similar results were obtained for PC 12 rat adrenal pheochromocytoma, as well as for rat hepatocytes (primary culture) on a substratum pre-conditioned by a solution of fibronectin and type I collagen, respectively, containing Pluronic F68.

5

MATERIAŁ

Confining cell adhesion to particular regions of dimension close to the cell size influences cell morphology, migration and metabolism [6] and thus offers new prospects in cell culture and tissue engineering. The method described above has the particularity that patterning is made directly on the polymer surface, without silicon or metal deposition.

Complexity of reality

The above investigations were extended to polymers of different natures [7]: polypropylene (PP), poly(ethylene terephthalate) (PET) and poly(methyl methacrylate) (PMMA), characterised by O/C surface concentration ratios equal to 0.01, 0.43 and 0.40, and water contact angles of 100°, 77° and 74°. In the absence of competitors (Pluronic F68, serum constituents), both adsorption of extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin, laminin) and attachment of WI 38 fibroblasts and ECV 304 endothelial cells did not differ significantly according to polymer wettability. In the presence of Pluronic F68, adsorption of proteins was almost completely prevented, except adsorption of fibronectin and laminin on PET, which was only reduced by a factor of 2 or 3. In the presence of Pluronic F68 (0,01 %) or fetal calf serum (1%) or both, cell attachment on PP and PMMA was appreciably lower, compared to that observed



FIG.2. A, lateral force microscopy image of PS processed by photolithography and oxygen plasma treatment. B, ToF-SIMS image recorded with CNO- ions on a patterned substrate conditioned with a solution of fibronectin and Pluronic F68. C, optical micrograph of MSC 80 mouse schwannoma on substratum processed as illustrated in a and b.

on PET. As the water contact angle of PMMA is very close to that of PET, this shows that overall wettability is not the only factor controlling the adsorption of ECM proteins in competition with other compounds. A first approach along that line, in the absence of competitor is presented below.

Nanoscale organisation of adsorbed collagen

The adsorption of type I collagen was further investigated by AFM [8] with polymer substrata covering a wide range of surface roughness and surface hydrophobicity : bisphenol A polycarbonate (PC), PET, and poly(vinylidene difluoride) (PVdF) used as such or treated by an oxygen plasma discharge (ox). The untreated polymers differed markedly by their surface roughness (rms from 0.5 to 11 nm) but had fairly close water contact angles (75 to 89°). Oxidation did not modify significantly the surface roughness but decreased the water contact angle (down to 52°, 31° and 69° for PCox, PETox and PvdFox, respectively).

On substrata exhibiting vertical topographic variations smaller that the collagen molecular diameter (1.5 mm), dotlike (on PC) and elongated structures (on PCox) were observed (FIGURE 3 A) and attributed to aggregated ends of collagen molecules (FIGURE 3 C). Extended rupture lengths were detected in the retraction force-distance curves (FIG-URE 3 B), suggesting the progressive tearing-off of the collagen molecules from the adsorbed phase (FIGURE 3 C). In contrast, on substrata showing vertical topographic variations larger than the collagen molecular thickness, the adsorbed collagen formed a film devoid of topographic features and no extended rupture lengths were observed. This indicates that a critical substratum height variation close to the collagen molecule size may affect the mobility of the adsorbed molecules and their tendency to aggregate in the adsorbed phase; this is not markedly influenced by surface hydrophobicity.

After drying (quick drying under nitrogen flow) the substrata with adsorbed collagen were examined by AFM in air. Patterns of aggregated structures were still visible on PC and PCox. With rough substrata, holes were observed



FIG.3. A, AFM topographic images (size 5 μ m x 5 μ m; z range = 15 nm) in water of PC and PCox after collagen adsorption (lighter = higher level). B, typical force-distance curve recorded (50 % of spots) in water after collagen adsorption. C, schematic representation of the film of collagen adsorbed on PC: top view (left), cross-section (middle) and interaction with the AFM probe upon retraction (right).

on PET and PVdF and not on PETox and PVdFox. They are attributed to the release of stresses created by shrinkage of a stiff adsorbed layer, occurring upon drying on a hydrophobic support.

Differences in the organisation of the adsorbed collagen layer (surface coverage, layer thickness) observed by AFM fitted well those found by models obtained from XPS and quantification of the adsorbed amount by using radiolabelled collagen [9]. This illustrates the complementarity of AFM, XPS and radiolabelling. The importance of the mobility of adsorbed collagen was further demonstrated by the influence of drying rate on the nanoscale organisation of the film adsorbed on PMMA [10]: fast drying by flushing with a nitrogen flow; slow drying under 95 % relative humidity. AFM revealed the formation of a net-like structure at slow drying rates. Comparison between the surface organisation, as observed by AFM, and surface models provided by XPS and contact angle measurements, indicated that chemically heterogeneous surfaces were produced at slow drying rates, PMMA being exposed at the outermost surface in the holes left by the collagen net.

References

[1]. Dewez, J.L., Berger, V., Schneider, Y.J. and Rouxhet, P.G., Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of collagen in the presence of Pluronic F68, albumin, or calf serum. J. Colloid Interface Sci., 191 (1997), 1-10.

[2]. Dewez, J.L., Schneider, Y.J. and Rouxhet, P.G., Coupled influence of substratum hydrophilicity and surfactant from culture medium on epithelial cell adhesion. J. Biomed. Mat. Res., 30 (1996), 373-383.

[3]. Dewez, J.L., Doren, A., Schneider, Y.J. and Rouxhet, P.G., Competitive adsorption of proteins : key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. Biomaterials, 20 (1999), 547-559.

[4]. Dewez, J.L., Lhoest, J.B., Detrait, E., Berger, V., Dupont-Gillain, C.C., Vincent, L.M., Schneider, Y.J., Bertrand, P. and Rouxhet, P.G., Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces : from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. Biomaterials, 19 (1998), 1441-1445.

[5]. Dewez, J.L., Lhoest, J.B., Detrait, E., Rouxhet, P.G., Bertrand, P. and Van den Bosch de Aguilar, Ph., Biomaterial and method for obtaining it. Belgian Patent n° 09401022, Nov. 14, 1994;International Patent Application PCT/BE 95/ 00104, Nov. 14, 1995

Conclusion

Competitive adsorption of proteins is a key to understand the influence of substratum hydrophobicity on mammalian cell adhesion. This concept offers interesting prospects for biomaterial applications. However hydrophobicity (or surface energy) is not the only factor influencing the adsorption behaviour. AFM demonstrated that the organisation of films of collagen adsorbed in the absence of competitor depends on collagen mobility, the latter being influenced by surface roughness rather than by surface hydrophobicity. The organisation of the film obtained after drying is determined by substratum roughness, substratum hydrophobicity and drying rate.

Acknowledgements

The support of National Foundation for Scientific Research (FNRS), of Foundation for Training in Industrial and Agricultural Research (FRIA), and of Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (Interuniversity Poles of Attraction Programme) is gratefully acknowledged.

[6]. Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G.P., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I.C., Whitesides, G.M. and Ingber, D.E., Engineering cell shape and function. Science, 264 (1994), 696-698.

[7]. Marchal, Th.G., Verfaillie, G., Legras, R., Trouet, A.B. and Rouxhet, P.G., Heterogeneous polymer surfaces used as biomaterials : protein adsorption and cell adhesion. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent, 63 (1998), 1109-1116.

[8]. Dufrene, Y.F., Marchal, Th. G. and Rouxhet, P.G., Influence of substratum surface properties on the organization of adsorbed collagen films : in situ characterization by atomic force microscopy. Langmuir 15 (1999), 2871-2878.

[9]. Dufrene, Y.F., Marchal, T.G. and Rouxhet, P.G., Probing the organization of adsorbed protein layers : complementarity of atomic force microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and radiolabelling. Appl. Surface Sci., (1999), in press.

[10]. Dupont-Gillain, C.C., Nysten, B. and Rouxhet, P.G., Collagen adsorption on poly(methyl methacrylate) : net-like structure formation upon drying. Polymer Int., 48 (1999), 271-276.

VARIOUS REINFORCEMENTS OF THE C/C COMPOSITE BONE PLATES AND THEIR INFLUENCE ON MECHANICAL PROPERTIES

Karel Balík*, Miroslav Sochor**, Josef Křena***, Bohuslav Cabrnoch**, Petr Glogar*, Iloslav Vilímek**, Vlasta Pešáková****

*INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS ASCR, PRAGUE, CZECH REPUBLIC **CZECH TECHNICAL UNIVERSITY, PRAGUE, CZECH REPUBLIC ***COMPOSITE, LETOV-ATG, S.R.O., PRAGUE, CZECH REPUBLIC ****INSTITUTE OF RHEUMATOLOGY, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Abstract

8

Carbon-carbon composite plates with three different reinforcement styles were manufactured and tested for mechanical properties and biocompatibility in view of their application as implants in bone surgery. Their stress state under load on bending was simulated by the Finite Element Method. The shape of the plates was designed to match the pig femur. The reinforcement was made of plain-weave carbon fabric lamina by stacking, coiling, or combination of both. Phenolic resin was used both as a precursor of the matrix and an impregnant. After final heat treatment at 2200°C a layer of pyrolytic carbon was deposited to reduce the formation of carbon particles. The plates with combined reinforcement yielded higher bending strength and lower stiffness on bending than those of human bones. Biocompatibility of the material was tested using "in vitro" and "in vivo" tests. The FEM stress distribution simulation yielded a good agreement of the failure location and bending strength value with the experimental data.

Key words: Carbon/carbon composite, bone fixation plates, reinforcement design, biocompatibility, strength and stiffness, modelling of mechanical properties

Progress in bone surgery is closely connected with the

Introduction

development of new materials used as connecting elements of fractured bones (i.e. bone fixation plates). The currently widely used metallic plates made of high-grade steel exhibit some disadvantages such as high rigidity that causes slow healing and may lead even to bone atrophy [1,6,7]. New materials exhibiting sufficiently high mechanical strength but considerably lower rigidity than metallic plates may eliminate this disadvantage. Among them, CFRP composites (carbon-fibre-reinforced polymer, e.g. carbon fibres embedded in an epoxide matrix) [6,7] and CFRC composites (carbon-fibre-reinforced carbon, carbon-carbon composites) play an important role. Preparation routes and properties of CFRP composites are already relatively well known but the carbon-carbon composites are still under development as they seem to be promising due to their excellent biocompatibility with tissue, blood and bones [2, 3]. Moreover, their mechanical properties can be adjusted by choosing properly the processing parameters and optimising the reinforcement design. For this purpose, a numerical stress analysis (e.g. finite element method, FEM) can yield useful data.

The present study discusses carbon-carbon composite plates manufactured in three different reinforcement

modes. They were tested for mechanical properties and biocompatibility from the viewpoint of application as implants in bone surgery, and their stress state under flexural loading was simulated by FEM.

Material and methods

The carbon-carbon composite plates were manufactured using carbon fabric plain-woven reinforcement with area density 273 g/m² and phenolformaldehyde resin matrix precursor.

The process consisted in soaking the fabric with an ethanol solution of the resin Umaform (product of SYNPO Pardubice, Czech Republic) and making a CFRP ("green") composite by curing the preform at 120°C in an autoclave in a silicon rubber mould under the pressure of 0.6 MPa. The green composites were converted to carbon-carbon ones by carbonisation up to 1000°C. They were further densified by several repeated cycles of impregnation with Umaform and recarbonisation, followed by final heat treatment to 2200°C and covering with a thin layer of pyrolytic carbon [4] in order to prevent dusting-off carbon microparticles under loading.

It was necessary to match the desired shape of the bone plate (FIG.1).



FIG.1. Dimensions of plates

Moreover, the complex loading pattern of the bone plate after its implantation to a fractured femur of pig required optimisation of the reinforcement layout. Therefore, three different arrangements were tested and compared: a) simple stacking of parallel fabric layers, b) coiling (winding) around the axis parallel to the plate length, and c) combination of the above-mentioned: coiling around a stack of three parallel layers that form a core.

Biocompatibility of the composite was tested by "in vitro" and "in vivo" tests.

The former consisted of a direct contact test (proliferation of cells on the tested material) and an extract test (metabolic activity of cells culture in medium containing liquid extracts from the composite material). The latter consisted of a histological study of surrounding tissue and capsule of implants which were subcutaneously implanted in rats (after 5 days, 1 and 2 months) and to an artificial defect in the pig femur (after 5 and 12 weeks).

From the mechanical viewpoint, the investigated plates were subjected to the three-point bending test to assess the plate strength and stiffness. The three-point bending arrangement to fit the INSTRON 1185 tensile test machine was employed. Due to the irregular plate shape, the elastic response of the plates was expressed as their stiffness on bending (i.e. product E I of the Young's modulus and the 2nd moment of the cross-sectional area) according to the formula

$$E I = \frac{F \cdot l^3}{48 \cdot v}$$

where: / - support span,

 ν - plate deflection at load F acting at the centre of the plate length.

The values of open porosity and apparent density were measured by the water penetration technique according to ASTM C-20 standard.

For FEM numerical simulation of the stress state exerted in loaded composite plates, a special set of experiments was performed to obtain necessary input data. Here, the bending strength was measured with the plates fixed by cortical screws to two aluminium alloy tubes. The purpose of thus chosen arrangement was to simulate real loading conditions of the plate mounted to a fractured femur. The bending moment causing plate failure was used for the simulation and the failure mode obtained experimentally was compared with the calculated stress distribution at failure.

Results

Biocompatibility tests "in vitro"

During the direct contact test the composite material exhibited very good cell population density and the cell prolif-

Biocompatibility tests "in vivo"

The composite samples implanted to rats induced a foreign-body response and they were surrounded by a connective tissue capsule. The same histological feature was observed, however, also in the case of the titanium reference implant. A variable number of carbon particles were found in the pig tissue in the vicinity of the implants. These debris were located even inside the compact bone adjacent to the implant. The implants and debris induced a foreign-body response accompanied with an extensive infiltration of the implant surrounding tissue by acid phosphatase positive macrophages and foreign-body giant multinucleated cells.

Mechanical properties

Results of the measurements of structural and mechanical properties of the bone plates in function of the reinforcement style are presented in the TABLE 1.

The composite plates manufactured according the three above-mentioned reinforcement techniques varied in their performance. Those produced by the simplest technique of stacked lamina (a) lacked any mechanism of out-of-plane reinforcement. Moreover, numerous matrix-rich regions without fibres were observed by inspection under optical microscope (Nikon Optiphot 100 S). The composite plates obtained by coiling the fabric reinforcement (b) revealed improved stiffness but they contained an enhanced amount of voids.

The best results were obtained with the plates prepared by a combined technique (c). They had the lowest open porosity and the highest apparent density.

Stiffness and strength analysis of the investigated plates were performed using the FEM code COSMOS/M (version 2.0). Due to the existence of 2 planes of symmetry, the constructed model represented only a quarter of the real body (FIG. 2). It contained the screw holes including the countersinking. The model consisted of the 8-node multilayer three-dimensional solid elements SOLIDL in the total number of 1728. It was loaded by a bending moment M_0 = 600 N mm induced by a force acting at the distance 30 mm from the xy

Reinforcement style	Fibre volume fraction [%]	Open porosity [%]	Apparent density [g · cm ⁻³]	Strength in bending [MPa]	Stiffness in bending E · I [N · mm ²]	Bending moment ⁺ [N · mm]
Stacking (a)	56	18	1.35	131	$1.7 \cdot 10^{6}$	3765
Coiling (b)	52	22	1.27	174	$2.75 \cdot 10^{6}$	5368
Stacking/Coiling (c)	58	13	1.45	241	$2.58 \cdot 10^{6}$	5854
* Bending moment at the location of the plate fracture						

TABLE 1. Mechanical properties of bone plates.

eration was comparable with that of a reference material (plastic).

The first three extracts exhibited no significant inhibiting or stimulating influence on the metabolic activity of the cells; further fifth and seventh extracts of this material exhibited moderate cytotoxicity.

Node	σ _z [MPa]	σ _x [MPa]	τ _{zx} [MPa]
1784	184.3	-5.8	0.3
13	161.6	9.2	0.9
93	-279.7	-21.5	3.4
109	-307.9	-20.2	.1.2

plane of symmetry. The boundary conditions were set as the zero displacement in the z and x directions for the xy and yz planes of symmetry, respectively. No displacement in the y direction was allowed in the xy plane.

 TABLE 2. Stresses in the C/C plate corresponding to the bending moment at failure.

10



FIG.2. Model of the C/C plate

For the strength analysis, the "maximum stress" criterion was used due to the lack of data required by the Tsai/Hill strength criterion. It was established experimentally that the investigated plate failed at the xy plane of symmetry when reaching the 18400 Nmm bending moment. The latter corresponded to the maximum strength in bending reaching approximately 170 MPa. The stress values calculated in selected nodes for the given bending moment at failure are listed in TABLE 2.

The maximum positive (tensile) stress is located at the xy plane of symmetry. Its value (184.3 MPa) is very close to the bending strength found experimentally.

Discussion

Our results demonstrated that the C/C composite can be a good support for attachment and growth of cells "in vitro". From immunohistological and histological results it is obvious that C/C composites implanted subcutaneously to rats induce a foreign-body response fully comparable with titanium, the biomaterial commonly used in clinical practice.

The application of the C/C implant to the pig bone was complicated by a high amount of carbon debris in the surrounding tissue. The observed C/C composite wear may be caused by mechanical loading of the plate during its fixation with metal cortical screws, because the rat tissue samples surrounding the subcutaneous implants did not contain any carbon debris.

Both the structure and mechanical behaviour of the investigated carbon-carbon composite plates can be to a considerable extent controlled by a suitable design of their fabric reinforcements. It is desirable to minimise the non-reinforced volume as well as redundant void content of the plates. This can be achieved by using the combined (stacked/coiled (c)) reinforcement style. The bending strength (240 MPa) reached in such a way is higher than the value given by Evans [5] for human bones (100 - 150 MPa). The stiffness on bending of the mentioned bone plate E.I (2.6 106 N mm²) is about 25 times lower than that of the bone, calculated from its known modulus of elasticity.

The FEM stress distribution simulation yielded a good agreement of both, failure location and bending strength value, with the experimental data.

Conclusions

It has been shown that it is feasible to manufacture bone plates of carbon-carbon fibre composites whose bending strength is higher and stiffness on bending is lower compared to those of human bones. Such a combination of mechanical properties is promising for eliminating some unfavourable consequences of using high-grade steel plates (slow healing, danger of the healed bone atrophy). Further work is needed, however, to cope with the problem of the minute carbon particle release from the plate into the tissue.

Acknowledgement

The Grant Agency of the Czech Republic supported the present investigation within the projects 106/96/1066 and 106/99/0626.

References

[1] Valenta, J. et al.: Biomechanics, Chapter 3, Academia, Prague (1993)

[2] Savage, G., Carbon-Carbon Composites, Chapter 9.6, Chapman & Hall, (1993)

[3] Pešáková V., Balík K., Klézl Z., Adam M.: Biomechanical and biological properties of the implant material carbon-carbon composites covered with pyrolytic carbon. Submitted to Journal of Materials Science: Materials in Medicine

[4] Balík, K., A study of C/C composites infiltrated and covered with pyrolytic carbon in a tumbling bed. Extended Abstract and Programme of Eurocarbon '98, Strasbourg (1998) pp. 655-656

[5] Evans, F. G.: Mechanical properties of bone. Edited by C.C. Thomas, Springfield (1973)

[6] Sochor M., Vtípil J.: Carbon-Fibre-Reinforced Composite Plates with a New Type of Epoxy Matrix Used for Internal Osteosynthesis of Long Bones. [RN]: In: 25th Aias National Conference, International Conference on Material Testing. Gallipoli: Politechnico di Bari. (1996) pp. 243-244.

[7] Sochor M., Vtípil J., Vilímek M.: Composite Plates Used in Internal Osteosynthesis of Long Bones. In: Third World Congress of Biomechanics - Abstract book. Sapporo: Hokkaido University (1998) p. 246.

ENKAPSULACJA KOMÓREK W CELU OTRZYMANIA HYBRYDOWYCH SZTUCZNYCH NARZĄDÓW

M. Kozicki^{*}, P. Kujawa^{*}, L. Pajewski^{**}, M. Kołodziejczyk^{***}, J. Narębski^{***}, J. M. Rosiak^{*}

* Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej w Łodzi ** Uniwersytet L'Aquila w L'Aquila, Włochy *** Instytut Chirurgii Endokrynologii Akademii Medycznej w Łodzi

Streszczenie

Komórki, zabezpieczone przed atakiem ze strony układu odpornościowego biorcy poprzez umieszczenie wewnątrz kapsuł polimerowych, stanowią obiecujący materiał w dziedzinie badań nad poszukiwaniem optymalnych układów, zdolnych do zastępowania uszkodzonych narządów. W artykule opisano dwie metody enkapsulacji komórek z użyciem alginianu sodu, usieciowanego jonami wapnia, jako wewnętrznej matrycy, w której znajdują się komórki. Stwierdzono, że dodatkowe otoczenie takiej kapsuły poli(alkoholem winylowym), usieciowanym za pomocą aldehydu glutarowego, powodowało denaturację białek komórki. Zastąpienie tej otoczki błoną z polimeru hydrofobowego, wytwarzana metoda wytracania miedzyfazowego, zwiększało przeżywalność komórek. Dobierając odpowiednio warunki procesu uzyskano membrany przez które przenikały związki niskocząsteczkowe (np. składniki odżywcze) i białka o małej masie cząsteczkowej. Otoczki te były natomiast nieprzenikalne dla dużych białek układu odpornościowego. Metoda ta stanowi obiecujący sposób enkapsulacji komórek, które nie byłby uszkadzane i charakteryzowałyby się długoterminową przeżywalnością po implantacii.

Słowa kluczowe: hybrydowe sztuczne organy, enkapsulacja, immobilizacja, alginian sodu, żele jonowe, sieciowanie

Wprowadzenie

Skutki wielu chorób natury endokrynologicznej (np. choroby trzustki, przytarczyc i tarczycy) można złagodzić lub wyeliminować na drodze przeszczepienia komórek narządowych. Podjęcie funkcji przez przeszczep allogeniczny lub ksenogeniczny uwarunkowane jest brakiem dostępu układu immunologicznego biorcy do transplantowanych komórek. Cel ten może zostać osiągnięty bez potrzeby stosowania środków immunosupresyjnych poprzez izolacje przeszczepianych komórek przy użyciu materiałów polimerowych. Komórki zabezpieczone przed ingerencją układu immunologicznego powinny, po wszczepieniu do

ENCAPSULATION OF LIVING CELLS TOWARDS • ARTIFICIAL, HYBRID ORGANS

M. Kozicki^{*}, P. Kujawa^{*}, L. Pajewski^{**}, M. Kołodziejczyk^{***}, J. Narębski^{***}, J. M. Rosiak^{*}

* INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ ** UNIVERSITY L'AQUILA, L'AQUILA, ITALY, *** INSTITUTE OF ENDOCRINAL SURGERY, MEDICAL ACADEMY IN ŁÓDŹ

Abstract

Living cells, protected from host immune system response in a manner of encapsulation inside polymer matrices, can provide surrogate device for maintaining or replacement of broken-down organs. In this paper two methods of living cells encapsulation are described. These methods are based on sodium alginate cross-linking induced by calcium cations. First attempt is based on an additional covering of alginate matrix by poly(vinyl alcohol) layer cross-linked with glutaraldehvde. However, this procedure caused denaturation of cellular proteins. Cells survived the process of encapsulation when the outer layer of the capsules was replaced by hydrophobic polymer membrane. This cover was produced using interfacial precipitation method. By selecting the appropriate conditions of encapsulation, the membranes permeable for low-molecular weight compounds (nutrients) and lowmolecular weight proteins were developed. However, the high-molecular weight immune system proteins (g-globulin) could not diffuse through the formed layer. Described method could be a convenient tool for the encapsulation of living cells which are not damaged and are characterised by long-term survival.

Keywords: hybrid artificial organs, encapsulation, immobilisation, sodium alginate, ionic gels, cross-linking

Introduction

The consequences of many endocrine diseases, like pancreas, thyroid or parathyroid disorders, can be alleviated or removed by transplantation of the appropriate organ cells. Normal functioning of an allogenic or xenogenic transplant is possible only if the host immune system has no access to the transplanted cells. This can be achieved, without application of immunosuppressants, by isolation of the transplanted cells with polymeric materials. The implanted cells, protected from the immune system reaction, should perform their usual functions, i. e. to secrete specific products, depending on the external stimuli. In addition, polymeric shell should be biocompatible and non-biodegradable, permeable for oxygen, nutrients, products of cell metabolism, and compounds, that stimulate its action. organizmu biorcy, spełniać swoje normalne funkcje tj. wydzielać specyficzne dla nich produkty w ilości zależnej od stymulacji zewnętrznej. Z kolei otoczka polimerowa powinna być biokompatybilna i niebiodegradowalna, przepuszczalna dla tlenu i substancji odżywczych, produktów przemiany materii wydzielanych przez enkapsulowane komórki oraz związków stymulujących ich pracę. Opłaszczająca membrana nie powinna przepuszczać jednakże składników układu immunologicznego biorcy.

Pierwsze próby wytwarzania enkapsulowanych komórek podejmowane były już w latach 60 i 70-tych. Jednak dopiero propozycje Lima dotyczące wytwarzania hybrydowej sztucznej trzustki [1] spowodowały wzrost zainteresowania tym kierunkiem badań biomedycznych. Lim zaproponował umieszczenie komórek w otoczce alginianu sodu usieciowanego jonami wapnia. Dodatkowo układy takie otaczane były poli(L-lizyną) lub innymi polikationami (chitozanem, dekstranem) [2]. W praktyce okazało się jednak, że po stosunkowo krótkim czasie kapsułki były otorbiane przez tkankę łączną, co uniemożliwiało ich funkcjonowanie [3]. Inne podejście prezentowane jest w pracach Seftona [4], w których komórki otaczane są polimerami syntetycznymi: kopolimerem metakrylanu metylu i metakrylanu hydroksyetylu z domieszką poli (N-winylopirolidonu).

W niniejszej pracy opisane są alternatywne metody enkapsulacji komórek oraz badania przenikalności wybranych związków przez powstałe membrany. Metoda enkapsulacji poprzez sieciowanie alginianu sodu za pomocą jonów wapnia została zmodyfikowana poprzez zastosowanie polimerów syntetycznych - poli(alkoholu winylowego) (PVAL) i polimeru hydrofobowego.

Materiały i metodyka

Otrzymywanie kapsułek alginianowych.

Do przygotowania kapsułek używano 3% roztworu alginianu sodu (Alg, Aldrich) w 0,9% wodnym roztworze chlorku sodu. Roztwór ten był wkraplany z biurety do naczynia zawierającego 0,15 mol dm⁻³ chlorku wapnia. Po wytworzeniu, kapsułki (średnica 2-3 mm) były pozostawione przez pewien czas (20 min.) w roztworze CaCl₂, a następnie przemywane 0,9% roztworem chlorku sodu.

Otrzymywanie kapsułek alginianowych otaczanych usieciowanym poli(alkoholem winylowym) (PVAL).

Przygotowany poprzez rozpuszczenie w podwyższonej temperaturze roztwór Alg (3%) i PVAL (3%) w 0,9 % NaCl był wkraplany jak w metodzie poprzedniej, do roztworu CaCl₂, a następnie przemywany roztworem NaCl. Kapsułki były zanurzane przez 1 minutę w roztworze aldehydu glutarowego (1%, pH 1,0) i przemywane roztworem soli fizjologicznej. Następnie były one umieszczane w roztworze PVAL (5 min, 3-8%), przenoszone ponownie do roztworu aldehydu glutarowego i ponownie przemywane. pH roztworów było ustalane przez dodanie odpowiedniej ilości kwasu solnego.

Otrzymywanie kapsułek alginianowych otaczanych polimerem hydrofobowym.

Wstępny etap polegał na przygotowaniu kapsułek alginianowych jak opisano wyżej używając 2% roztworu Alg w 0,9 % NaCl. Następnie były umieszczane w 3% roztworze Alg i przeniesione do roztworu CaCl₂ (czas kontaktu 3 min.). W ten sposób na kapsułkach powstawała dodatkowa, zewnętrzna otoczka usieciowanego alginianu. Tak przygotowane kapsułki wprowadzane były do roztworu polimeru hydrofobowego w acetonie (stężenie 7-15%). Umieszczenie kapsułek w wodzie powodowało wytrącanie zaadsorbowanego na powierzchni polimeru. Dwukrotna kąpiel w acetonowym roztworze polimeru, połączona z wytrącaniem However, this polymeric membrane cannot be permeable for the components of the host immune system.

Although the first attempts to produce the encapsulated cells were made in the 1960-ties and 1970-ties, the growing interest in this research area started with the pioneering work of Lim, concerning preparation of artificial pancreas [1]. The proposed system is based on the cross-linking of sodium alginate with calcium ions in aqueous solution in which the encapsulated cells are placed. Additionally, such capsules can be modified with a supplemental layer of poly(L-lysine) or other polycations (chitosan, dextran) [2]. However, the systems of this type cannot be successfully applied in practice because of the capsules encystment with connective tissue [3]. Different approach to the encapsulation problem is presented by Sefton [4] who describes a system in which the cells are closed in synthetic polymer capsules. In this case, copolymers of methyl methacrylate and hydroxyethyl methacrylate with poly(N-vinylpyrrolidone) were used as the coating materials.

In this paper we describe an alternative method of cells encapsulation as well as studies on permeability of the formed membranes by the compounds of different size. The improvement of the method of sodium alginate crosslinking by an addition of poly(vinyl alcohol) (PVAL) or hydrophobic polymer is also reported.

Materials and methods

Alginate capsules formation.

Solution of 3% (w/v) sodium alginate (Alg, Aldrich) in 0.9% sodium chloride was dropped from burette or Pasteur pipette in a glass vessel containing $CaCl_2$ (0.15 M). The droplets (diameter ca. 2-3 mm) jellied. The formed calcium alginate beads were then kept for some time (20 min) in the $CaCl_2$ solution. Finally, they were washed with 0.9% NaCl solution.

Alginate capsules covered with crosslinked poly(vinyl alcohol) (PVAL).

Mixture of Alg (3% w/v) and PVAL (3% w/v) in 0.9% sodium chloride aqueous solution was prepared at elevated temperature. Resulting solution was dropped in calcium chloride solution, followed by washing of resulting droplets with 0.9% NaCl. Subsequently, the capsules were kept in glutaraldehyde solution (1%, pH 1.0) for 1 min, in order to form crosslinks between PVAL chains, and washed again. Next, the beads were immersed for 5 min. in PVAL solution (3-8%), then transferred once more to glutaraldehyde solution. The pH of glutaraldehyde solutions was adjusted with HCl.

Alginate capsules covered with hydrophobic polymer

The initial stage was identical with the one described above, except that 2% Alg solution in 0.9% NaCl was used. Additionally, capsules were placed in 3% Alg solution and transferred to CaCl₂ solution for 5 min. in order to form new, outer layer of crosslinked alginate. Beads prepared in such way were placed in acetone solution of polymer, concentration 7-15%, and subsequently immersed in water. As this polymer is not soluble in water, it precipitates at the surface of alginate capsules. Repetition of this procedure results in thicker and more mechanical resistant coating.

Permeability studies.

Permeability of model compounds and cells through the walls of the formed beads was measured spectrophotometrically. As a model for low-molecular compounds the wellknown dye, rhodamine B (Allied Chemical), was chosen. Its molecular weight is 395 g mol⁻¹ and the absorbance can be measured at λ =556 nm (extinction coefficient ε =1.1·10⁵ dm³mol⁻¹cm⁻¹ [5]). As model proteins, human albumin (ZLB, Swiss Red Cross, molecular weight

M ATERIALOW

otoczki w wodzie, powodowała tworzenie się powłoki o większej grubości i wytrzymałości na mechaniczne uszkodzenia.

Badanie przepuszczalności ścian kapsułek.

Przenikalność modelowych związków przez wytworzone membrany była mierzona spektrofotometrycznie. Modelowym związkiem niskocząsteczkowym był barwnik rodamina B (Allied Chemical, M=395 g mol-1), którego widmo absorpcyjne posiada maksimum przy 556 nm (współczynnik absorpcji ɛ=1.105 dm3mol-1cm-1 [5]). Modelowymi białkami były: albumina ludzka (ZLB Centralne Laboratorium Krwiodawstwa Szwajcarskiego Czerwonego Krzyża, 68 tys. Da) oznaczana przy λ =220 nm (ϵ =1,5·10⁶ dm³mol⁻¹cm⁻¹[6]) i γ-globulina ludzka (Biomed, 180 tys. Da) oznaczana przy λ =210 nm (ϵ =3,4 106 dm³mol⁻¹cm⁻¹ [6]). Jako modelowe komórki posłużyły czerwone ciałka krwi królika. Gdyby komórki te przenikały przez ścianki kapsułki do wody lub ulegały uszkodzeniu podczas ich enkapsulacji natychmiast następowałaby ich hemoliza i uwalnianie hemoglobiny, której absorbancję można łatwo oznaczać. Stężenie hemoglobiny było mierzone przy 540 nm (ε =820 dm³mol⁻¹ cm⁻¹). Barwnik, modelowe białka lub erytrocyty dodane były do roztworu Alg lub Alg/PVAL przed przygotowaniem kapsułek. które, po utworzeniu i przemyciu, były zanurzane w znanej objętości wody. Próbki tego roztworu były pobierane, a ich absorbancja mierzona za pomocą spektrofotometru Hewlett Packard 84524.

Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM).

Zdjęcia powierzchni i przekrojów poprzecznych kapsułek wykonane były za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Jeol 35C w Instytucie Włókien Chemicznych w Łodzi. Przed wykonaniem zdjęć próbki były liofilizowane i suszone. Następnie na ich powierzchnie napylane było złoto.

Wyniki i dyskusja

Łańcuchy polimerowe alginianów mają charakter anionowy i łatwo żelują w obecności kationów wielowartościowych metali, np. jonów wapnia. Właściwość ta jest szeroko wy-

68 000 Da) and γ -globulin (Biomed, Poland, molecular weight - 180 000 Da) were chosen. The concentration of albumin and γ -globulin was determined at λ =220 nm $(\epsilon = 1.5 \cdot 10^{6} \text{ dm}^{3} \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [6]) and $\lambda = 210 \text{ nm} (\epsilon = 3.4 \cdot 10^{6} \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dm³mol⁻¹cm⁻¹ [6]), respectively. Rabbit erythrocytes were chosen as model cells. In case they diffuse through capsule walls to water outside the beads, immediate haemolysis and haemoglobin release occur. The concentration of released haemoglobin can then be measured spectrometrically at λ =540 nm (ϵ =820 dm³mol⁻¹cm⁻¹). The dye, model proteins and erythrocytes were added to the alginate or alginate/PVAL solution before preparation of the beads. After formation and washing of spheres, they were kept in a known amount of water. Samples of the solution were collected at different intervals of time and absorbance was measured with use of Hewlett Packard 84524 spectrophotometer.

Scanning electron microscopy (SEM).

Pictures of surface and cross -sections of capsules were taken using scanning electron microscope Jeol 35C in the Institute of Chemical Fibres, in Łódź. Samples were prepared by freeze-drying. The fractured surfaces were coated with gold.

Results and discussion

The polymeric chains of alginate have anionic character and can be easily cross-linked in the presence of multivalent metal cations, e. g. calcium cations. This makes these systems very useful for preparation of ionic gels used for in the formation of artificial, hybrid organs [1,7,8]. Additionally, cross-linked PVAL is a convenient and non-toxic biomaterial applied as a membrane in artificial pancreas or kidney, wound dressing and materials designed for contact with blood [9,10]. PVAL undergoes cross-linking reaction with glutaraldehyde in acidic solution [11]. The produced capsules consisted of the inner opaque alginate layer, in which the studied compounds or cells were placed, and inner transparent and soft coating of cross-linked PVAL. In the studied time-scale the dye diffuses rapidly through the capsule walls, but the erythrocytes release was not observed

korzystywana do wytwarzania jonowych żeli, stosowanych m. in. do otrzymywania hybrydowych sztucznych organów [1,7,8]. Z kolei usieciowany PVAL jest dogodnym i nietoksycznym biomateriałem używanym m. in. do produkcji membran sztucznej trzustki i nerki, opatrunków i materiałów kontaktujących się z krwią [9,10].



strained by the polymer network. The various PVAL concentration in forming solution does not change significantly the rate of studied compounds release, but the harsh conditions of the process (low DH value,

I MATERIALO

(FIG.1.). The

cells are big

enough to be

effectively re-

blood

red

RYS. 1. Kinetyka uwalniania rodaminy B i czerwonych ciałek krwi z kapsułek alginianowych (Alg) i z kapsułek alginianowych z zewnętrzną otoczką wykonaną z PVAL usieciowanego aldehydem glutarowym (Alg/PVAL).

FIG. 1. Kinetics of rhodamine-B and erythrocytes release from alginate capsules (Alg) and from alginate capsules additionally coated with the outer layer formed by PVAL crosslinked with glutaraldehyde.

Polimer ten łatwo sieciuje w kwaśnym środowisku w obecności aldehydu glutarowego [11]. Otrzymane kapsułki zbudowane były z wewnętrznej, mętnej sfery alginianowej, w której umieszczone były związki lub komórki, których dyfuzje badano. Na zewnątrz były one otoczone przezroczystą i miękką warstwą usieciowanego PVAL. W badanej skali czasowej barwnik łatwo przenikał przez ścianki kapsułek, natomiast uwalnianie czerwonych ciałek krwi praktycznie nie było obserwowane (RYS. 1.). Komórki erytrocytów są na tyle duże, by ich przenikanie przez sieć polimerową było w znacznym stopniu zahamowane.

Stężenie PVAL w roztworze formującym nie miało znacznego wpływu na szybkość uwalniania badanych substancji, jednak drastyczne warunki procesu (niskie pH, obecność glutaraldehydu) powodowały obumieranie immobilizowanych komórek [12]. Ze względu na to, podjęte zostały próby opracowania technologii wytwarzania kapsułek używając metody wytrącania międzyfazowego przy zastosowaniu innego polimeru [4]. Kapsułki otrzymane tą metodą mają stosunkowo mocne, nieprzezroczyste ścianki, wewnątrz których zamknięty jest żel alginianowy z enkapsulowanym materiałem. Stwierdzono, że otoczki wykonane z polimeru hydrofobowego nie stanowią istotnej przeszkody dla dyfuzji zawartego wewnątrz barwnika, który ze względu na niewielkie rozmiary może łatwo przenikać przez sieć

RYS. 2. Zdjęcia SEM fragmentów polimerowej membrany zewnętrznej wykonanej z polimeru hydrofobowego (powiększenie 1000 razy). Stężenie roztworu formującego a) 7%, b) 15%.



glutaraldehyde presence) caused protein denaturation and cells haemolysis [12]. For that reason, different attempts to establish a new technology of capsule formation were implemented. The chosen method is based on interfacial precipitation of hydrophobic polymer [4]. The beads produced with use of this method have relatively strong opaque walls. inside of which alginate gel together with encapsulated material is placed. It was stated that covering of the alginate capsules with this polymer does not inhibit significantly the dye diffusion. With regard to small dimensions compared to the mesh size in polymer network, it can easily permeate through the Alg gel and the outer polymer layer. This feature is of great importance, because described membranes should be permeable by the compounds of lowmolecular weight. Increasing number of outer polymer layers or increasing the concentration of this polymer in the forming solution results in significant retardation of diffusion [6]. It is connected with decreasing of pore diameter and narrowing of its size distribution, as the concentration of forming solution increases. This can be seen while comparing the SEM micrograph of the polymer coating produced with 7% and with 15% solution (FIG. 2.).

Observed diffusion retardation was even more pronounced in the case of albumin and γ -globulin macromolecules. The higher was the concentration of the forming solution, the

> FIG. 2. SEM micrographs of the outer polymeric membrane (magnification 1000 times). Concentration of forming polymer solution a) 7%, b) 15%.

polimerową. Jest to zaletą badanego materiału, jako że membrany takie powinny być przenikalne dla związków o niskich masach cząsteczkowych. Zwiększenie grubości otoczek i stężenia roztworu formującego powoduje znaczące spowolnienie procesu dyfuzji [6]. Jest to związane ze zmniejslower they permeated through the capsule walls. Moreover, the maximum amount of released γ -globulin was lower than in the case of albumin, in spite of the same kinetic pattern in the early stages of their release (FIG. 3.).

szaniem średnicy porów w miarę zwiększania stężenia roztworu formującego otoczkę, co jest widoczne na zdjęciach mikroskopowych (RYS. 2.).

Obserwowane spowalnianie przenikania było jeszcze bardziej widoczne w przypadku cząsteczek białek-dyfundowały one tym wolniej, im większe było stężenie roztworu użytego do wytwarzania zewnętrznej otoczki. Co więcej, maksymalny poziom uwolnionej γ globuliny był niższy w porównaniu z albuminą, pomimo tego, iż w początkowym etapie przebieg kinetyki uwalniania był jednakowy dla obu białek (RYS. 3.).



Rys. 3. Kinetyka uwalniania albuminy i γ-globuliny ludzkiej z kapsułek alginianowych pokrytych dodatkową podwójną otoczką wykonaną z polimeru hydrofobowego (stężenie polimeru w roztworze formującym - 15%).

Fig. 3. Kinetics of albumin and γ -globulin release from alginate capsules covered with twofold polymer coating (concentration of forming solution - 15%).

Wynika to z różnicy wielkości cząsteczek badanych związków. Mniejsza albumina uwalniana jest z wnętrza i wymywana z powierzchni kuleczek, natomiast większa cząsteczka γ -globuliny właściwie nie wydostaje się z zamkniętego wnętrza kapsułek, a jej początkowe uwalnianie związane jest z wymywaniem z powierzchni membrany i z jej porów.

Wnioski

Przedstawiona metoda enkapsulacji żywych komórek w żelach alginianowych otoczonych powłoką polimeru hydrofobowego stanowi obiecujący sposób otrzymania hybrydowych sztucznych narządów. Dobór odpowiednich warunków zapewnia swobodne przenikanie przez wytworzone membrany związków niskocząsteczkowych, jak również dyfuzję białek o niewielkiej masie cząsteczkowej (albuminy). Jednocześnie, przez tak wytworzoną powłokę praktycznie niemożliwa jest dyfuzja γ-globuliny, białka charakterystycznego dla układu odpornościowego. Zastosowanie do wytwarzania zewnętrznej otoczki PVAL usieciowanego aldehydem glutarowym powoduje obumieranie komórek, znajdujących się wewnątrz kapsułek, ze względu na drastyczne warunki sieciowania.

Istotnym problemem jest zapewnienie enkapsulowanym komórkom możliwie najlepszych warunków rozwoju i uniknięcie ich wzajemnego zatruwania przez produkty przemiany materii, tak aby mogły one rosnąć i dzielić się. Prowadzone w chwili obecnej badania polegające na wytwarzaniu żelu alginianowego o specjalnej, komorowej strukturze stanowią obiecujące rozwiązanie tego problemu.

Podziękowania

Autorzy dziękują Profesorowi Henrykowi Struszczykowi z Instytutu Włókien Chemicznych w Łodzi za możliwość użytkowania skaningowego mikroskopu elektronowego i pomoc w wykonaniu zdjęć. Badania wykonane zostały w ramach polsko-włoskiej umowy rządowej, projekt nr 260/R99/R00.

Piśmiennictwo

Lim F. i Sun A. M., Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. Science, 210 (1980), 908-910.
 Huget M. L., Neufeld R. J., i Dellacherie, Calcium-Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers: Comparison of Chitosan and DEAE-Dextran. Process Biochem., 31 (1996), 347-353.

[3] O'Shea G. M. i Sun A. M., Encapsulation of Rat Islets of Langerhans Prolongs Xenograft Survival in Diabetic Mouse. Diabetes, 35, (1986), 943-946.

[4] Uludag H., Kharlip L. i Sefton M. V., Protein Delivery by Microencapsulated Cells. Adv. Drug Deliv. Rev., 10 (1993), 115-130 i literatura tam cytowana.

[5] Gal M. E., Kelly G. R. i Kurutsev T., Derivation and interpretation of the spectra of aggregates. Part 2. Dimer of rhodamine B in aqueous solution. J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 69 (1973), 395-402.

[6] Kozicki M., Praca Magisterska, Politechnika Łódzka, 1998.

It is probably caused by different sizes of the studied proteins. Smaller albumin molecules are released from the inner space of the beads and washed away from the surface, while bigger γ -globulin ones cannot escape from the inside and are only delivered from the membrane surface and from its pores.

Conclusions

The described method of living cells encapsulation in alginate gels coated with hydrophobic polymer layer is a promising way in order to produce artificial, hybrid organs. The choice of appropriate conditions ensures free diffusion of low-molecular weight compounds through formed membranes, as well as their permeability by small proteins (albumin). At the same time, the diffusion of the immune system protein (γ -globulin) through the bead walls is constrained. Application of cross-linked PVAL to the produc*tion of the outer layer results in encapsulated cell damage*. This is because of the very rough cross-linking conditions.

The problem, which should be resolved in our further investigation, is how to provide the cells with the most suitable living conditions and how to avoid their damage caused by the products of the metabolism. Studies connected with these questions are currently performed by our group. They are connected with a development of a new system of alginate gel with special, spherical chamber structure.

Acknowledgements

Authors would like to thank to Prof. Henryk Struszczyk from the Institute of Chemical Fibres, Łódź, for the kind possibility of using scanning electron microscope and assistance in the analyse. This work is partially financed by the Polish-Italian government agreement (project No. 260/R99/R00).

References

[7] Dumitriu S., Vidal P. F i Chornet E., Hydrogel Based on Polysaccharides. W: Dumitriu S. (Ed.), Polysaccharides in Medical Applications., Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
[8] Cohen S., Bano C., Visscher K. B., Crow M., Allock M. R. i Langer R. S., U.S. Patent nr 54944682 (1996).

[9] Peppas N. A. Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and its copolymers. W: Peppas N. A. (Ed.), Hydrogels in medicine and pharmacy., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987.

[10] Burczak K., Gamian E i Kochman A., Long-term In Vivo Performance and Biocompatibility of Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Macrocapsules for Hybrid-type Artificial Pancreas. Biomaterials, 17 (1996), 2351-2356.

[11] Toyoshima K., Acetalization of Polyvinyl Alcohol. W: Finch C. A. (Ed.), Polyvinyl Alcohol. Properties and Applications., Wiley & Sons, London, 1973.

[12] P. Kujawa, M. Lemiesz, M. Kołodziejczyk, J. Narębski, L. A. Pajewski i J. M. Rosiak, Encapsulation of Living Cells in Alginate and Alginate/PVAL Hydrogels. International Workshop Bioencapsulation VI, Barcelona, Hiszpania, T2.4 (1997).

TRYBOLOGICZNE ...¹⁶... ZUŻYCIE POLIETYLENU UHMWPER

SCHULTE*, B.CLEFF*, A. PAWELEC**, J. OTFINOWSKI***, B.FRAŃCZUK***, M. LEKKA****, J. LEKKI****, Z. STACHURA****

* Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany ** Klinika Ortopedii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie *** Klinika Traumatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie **** Instytut Fizyki Jądrowej w Krakowie

Streszczenie

Polietylen o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej UHMWPE / Chirulen DIN 58834 / był poddany badaniom na zużycie trybologiczne w urządzeniach typu pin-on-disc i ring-on-disc w powietrzu oraz w środowisku ciekłym. Uzyskane cząsteczki polietylenu będące produktami zużycia miały przeważnie zaokraglone kształty, a ich wymiary nie przekraczały 500, µm. W tym samym przedziale wielkości zawierały się też rozmiary cząstek o kształtach nieregularnych. Topografia śladów zużycia oraz szorstkości powierzchni były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu sił (SFM). Wyniki badań zostały porównane z danymi otrzymanymi na podstawie analizy czasteczek UHMWPE znalezionych w tkankach pobranych podczas operacyjnej wymiany endoprotez stawu biodrowego.

Słowa kluczowe: polietylen UHMWPE, produkty zużycia, trybologia

Wstęp

Aseptyczne obluzowanie protezy jest częstą i bardzo poważną komplikacją całkowitej alloplastyki stawu biodrowego wymagającą wymiany implantowanej endoprotezy. Tkanki pobrane podczas operacyjnej wymiany endoprote zy zawierają często, obok akrylowych i metalicznych fragmentów, także cząsteczki polietylenu pochodzące ze zużytej panewki polietylenowej. Badanie histologiczne tkanek okołoprotezowych pobranych podczas wymiany endoprotez pokazało, że cząsteczki polietylenu były częściej znajdowane w wypadku aseptycznego obluzowania endoprotezy, niż w przypadku obluzowania spowodowanego infekcją. Rudzki i in. w publikacji [1] zakłada, że aseptyczne obluzowanie protezy może mieć przyczynę w przyspieszonym zużyciu i bardziej intensywnej destrukcji polietylenowej panewki.

W celu poznania procesu zużycia trybologicznego polietylenu i mechanizmu jego destrukcji poddano powierzchnię polietylenu UHMWPE- Chirulen DIN 58834 (Hoechst AG, Oberhausen, Germany) działaniu tarcia w aparacie wyposażonym w metalowy bolec (pin-on-disc) oraz metalowy pierścień (ring-on-disc). Oderwane w wyniku tarcia cząsteczki polietylenu zbadano oceniając ich wielkość i kształt. Zbadano również charakter śladów powstałych wskutek tarcia na powierzchni polietylenu oraz stopień zużycia metalowego bolca użytego jako przeciwciało trące [2].

.

UHMWPE WEAR BY TRIBOLOGICAL LOAD

R. Schulte*, B.Cleff*, A. Pawelec**, J. Otfinowski***, B.Frańczuk***,

M. LEKKA****, J. LEKKI****, Z. STACHURA****

* Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany ** Department of Orthopaedics

COLLEGIUM MEDICUM JAGIELLONIAN UNIVERSITY IN CRACOW

COLLEGIUM MEDICUM JAGIELLONIAN UNIVERSITY IN CRACOW

Abstract

Ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) was tribologically loaded in a pin-on-disk and in a ring-on-disk tribo-tester under dry and wet conditions. PE wear particles were found to be mainly round with dimensions up to 500 µm. Length and thickness of irregularily shaped debris were within this range of dimensions, too. Wear trace topography and roughness were analyzed by means of a scanning force microscope (SFM). The results are compared with the appearence of UHMWPE debris in tissues resected on revision surgery of the total hip replacement.

Key words: polyethylen UHMWPE, wear debris, tribology.

Introduction

Aseptic loosening of the prosthesis is the most common complication in the total hip replacement. Beside acrylic and metallic fragments the tissues resected on revision surgery often contain polyethylene debris originating from the worn acetabulum. The study of the histological appearance of the periprosthetic capsule in failed total hip arthroplasty [1] has shown that polyethylene particles were more often encountered in the case of aseptic implant loosening compared to the loosening due to infection. Rudzki et al [1] assume that the aseptic arthroplasty failure may have its source in an accelerated wear and in a more intense degradation of the polyethylene cup.

In order to gain more insight into wear and degradation of ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) on tribological loading we studied debris and wear traces of UHMWPE disks after treatment with a metal rounded pin or a metal ring in a tribo-tester [2].

Methods

UHMWPE disks (15 mm diameter, 2 mm thick) were mounted in a standard pin-on-disk tribo-tester [3]. As a

I MATERIALOW

Metodyka

Cylindryczne dyski UHMWPE o średnicy 15 mm i grubości 2 mm były umieszczane w standardowym urządzeniu do pomiaru siły tarcia [3]. Jako trące przeciwciała używany był bolec o średnicy 4 mm i zaokrąglonym końcu, poruszający się po okręgu o promieniu 5,5 mm, a także pierścień o średnicy zewnętrznej 13 mm i wewnętrznej 9 mm obracający się wokół swego środka. Oba przeciwciała trące wykonane były ze stopu TiV4A16. Obciążenie przeciwciała wynosiło w obu przypadkach 100 g, a względna prędkość liniowa próbki w odniesieniu do bolca i pierścienia miała wartość 3,5 cm/sek. Czas pomiaru wynosił 2 godziny. Testy przeprowadzone były w powietrzu oraz w środowisku ciekłym (roztwory: H_2O i 0,9% NaCl). Każdy test był wykonywany z nowym zestawem próbka - przeciwciało trące.

W przypadku pomiarów dokonywanych w powietrzu cząsteczki polietylenu zbierane były poprzez filtrowanie wody używanej do późniejszego spłukiwania polietylenowych dysków i przeciwciał trących. W przypadku pomiarów dokonywanych w środowisku ciekłym filtrowano płyn używany do eksperymentu. Rozmiary porów w mikrofiltrach zbudowanych z włókien szklanych wynosiły 10 μ m, co ograniczało minimalne rozmiary zbieranych cząsteczek. Wielkość i kształt oraz ilość cząsteczek polietytlenu oceniano w mikroskopie optycznym.

Uszkodzenia powierzchni polietylenowych dysków były badane poprzez analizę śladów zużycia przy użyciu skaningowego mikroskopu sił /SFM/, przy rozdzielczości w kierunku pionowym ok. 3 nm. Zebrane obrazy pozwoliły na ocenę średniej wartości szorstkości ścieranej powierzchni oraz pomiary głębokości powstających na niej ubytków. Zużycie metalowego bolca zostało ocenione na podstawie obserwacji zmian kształtu jego końcówki oraz objętości jego zużycia.

Wyniki

Wyniki przeprowadzonych testów trybologicznych przedstawiono w tabelach 1-4 oraz na RYSUNKU 1.

TABELE 1-3 oraz RYSUNEK 1 opisują ilość uzyskanych cząsteczek UHMWPE oraz rozkład ich rozmiarów w zależności od środowiska w jakim przeprowadzano testy.

W TABELI 4 przedstawiono wielkość zużycia końcówki metalowego bolca w zależności od środowiska w jakim przeprowadzano eksperyment.

Badania topografii dna śladów wyżłobionych podczas różnych testów trybologicznych na powierzchni polietylenu oraz wartości średniokwadratowe szorstkości powierzchni przedstawia TABELA 5. Podano w niej wyniki szorstkości zmierzone w dwóch różnych obszarach śladu oraz maksymalną głębokość śladu również mierzoną w dwóch różnych, wybranych losowo obszarach śladu, których powierzchnia wynosiła każdorazowo 2x2 mm.

Środowisko Medium	Bolec Pin	Pierścień Ring
suche / dry	18031	106974
H ₂ O	2646	3666
NaCl	15611	2343

TABELA 1. Ilość zebranych cząsteczek polietylenu.

TABLE 1. Total number of collected UHMWPE debris particles.

counterbody we took a rounded pin (4 mm diameter) running on a wear trace radius of 5.5 mm as well as a ring (outer diameter 13 mm, inner diameter 9 mm) both made of the TiV4A16 alloy. The load was 100 g in both cases, the relative speed of the turning disk with respect to the fixed pin or ring was 3.5 cm/s. Testing time was 2 h per run. The tests were done in dry as well as in wet (H₂O or 0.9 % NaCI solution) environment. Each test was performed with a new set of disk/metal counterbody.

Polyethylene debris particles were collected by filtering water slurry which resulted from washing the disk/counterbody system after the test in the case of dry friction, or that produced in wet testing. Pore size of glass-fibre microfilters was 10 μ m which limited the minimum diameter of the collected wear particles. Size, shape and quantity of the particles were estimated using optical microscope.

Degradation of the polyethylene disks was studied by analysing the topography of wear trace bottom by means of a scanning force microscope (SFM) with vertical resolution of about 3 nm. Mean roughness as well as maximum height of damages were taken from these pictures. Wear volumes of the rounded pins were calculated from the size of degradation areas at the top of pins.

Results

The results of the tribological tests are shown in TABLES 1-4 and in FIGURE 1.

TABLES 1-3 and FIGURE 1 show the amount of UHMWPE debris and particle size distributions found for the different tribological conditions. The wear volumes at the top of the rounded pins after a 2 h run in the tribo-tester are presented in TABLE 4.

Study of wear traces on the UHMWPE disks by SFM was done in order to analyze the topography at the bottom of the traces and to get the mean roughness as well as the maximum height of degradation damages. FIGURE 2 shows some of the SFM images; TABLE 5 gives values of roughness and local damages at two different places of the corresponding wear traces.

Środowisko Medium	Bolec Pin	Pierścień Ring
suche / dry	99 %	91 %
H ₂ O	68 %	54 %
NaCl	92 %	93.4 %

TABELA 2. Odsetek zaokrąglonych cząsteczek polietylenu w materiale uzyskanym podczas testów.

TABLE 2. Percentage of collected UHMWPE debris particles which are round.

MATERIALOV

Środowisko Medium	Bolec Pin [um]	Pierścień Ring [um]
suche / dry	400 x 350	100 x 50
H ₂ O	200 x 20	400 x 200
NaCl	250 x 250	150 x 75

TABELA 3. Rozmiary największych cząsteczek polietylenu uzyskanych podczas testów. TABLE 3. Dimensions of largest collected UHMWPE particles.

Środowisko Medium	Objętość zużycia Wear volume of rounded pin [mm ³]
suche / dry	0.2
H ₂ O	0.05
NaCl	0.006

TABELA 4. Zużycie końcówki bolca. TABLE 4. Wear volume at the top of the rounded pins.



RYS.1. Wielkość i rozkład ilościowy uzyskanych cząsteczek UHMWPE w zależności od rodzaju testu trybologicznego (wielkość: długość x grubość w μm): a) środowisko suche – bolec, b) środowisko suche – pierścień, c) H₂O – bolec, d) H₂O – pierścień, e) 0,9% NaCl – bolec, f) 0,9% NaCl – pierścień.

FIG. 1. UHMWPE debris particles size distribution in different ambients (size: length x thickness in μ m): a) dry environment – pin, b) dry – ring c) H₂O – pin d) H₂O – ring e) NaCI – pin f) NaCI – ring.

Środowisko	Bolec m	etalowy	Pierścień	metalowy
	Round	ed pin	Rii	ng
Medium	σ	h _{max}	σ	h _{max}
	[nm]	[nm]	[nm]	[nm]
suche / dry	99	5868	1037	5918
	448	4032	1330	6771
H ₂ O	842	6544	211	1877
	1698	8865	130	701
NaCl	164	1214	357	3948
	100	1110	345	2150

TABELA 5. Wartość średniokwadratowa szorstkości powierzchni σ oraz maksymalna głębokość śladów zużycia polietylenu.

TABLE 5. Mean roughness σ and maximum height of damages at the bottom of wear traces.



RYS. 2. Topografia dna śladu wyżłobionego podczas tarcia mierzona z użyciem skaningowego mikroskopu sił (SFM): a) środowisko suche – bolec, b) środowisko suche – pierścień, c) NaCI – bolec, d) NaCI – pierścień.

FIG. 2. Topography of wear trace bottom as measured by SFM: a) dry environment – pin, b) dry – ring, c) NaCI – pin, d) NaCI – ring.

Omówienie

Przeprowadzone testy trybologiczne wskazują, że zużycie polietylenu UHMWPE pod działaniem metalowego przeciwciała jest zależne od warunków zwilżania. Wzrasta ono bowiem wyraźnie w warunkach tarcia suchego, na co wskazuje zarówno ilość wyprodukowanych cząstek polietylenu, zwłaszcza w wypadku użycia metalowego pierścienia, jak również stopień zużycia końcówki metalowego bolca. Tworzące się podczas testów trybologicznych cząsteczki polietylenu miały na ogół kształty zaokrąglone. Tworzenie się cząsteczek o bardziej nieregularnych kształtach nasilało się w środowisku wodnym niezależnie od rodzaju przeprowadzanego testu.

W wypadku eksperymentu z bolcem w roztworze NaCl ilość wyprodukowanych cząsteczek polietylenu jest zaskakująco duża w porównaniu z ilością uzyskaną w środowisku wodnym. Może to wynikać z faktu, że cząsteczki UHMWPE powstające w środowisku wodnym są mniejsze niż uzyskiwane w roztworze NaCl. W takiej sytuacji, przy zastosowaniu filtru zatrzymującego cząsteczki większe od 10 μ m, całkowita ilość zebranych cząstek w środowisku NaCl będzie większa niż w środowisku wodnym.

Badanie topografii dna śladów tarcia wskazuje na brak korelacji pomiędzy średnia wartościa szorstkości ścieranej powierzchni a największą głębokością tworzących się na powierzchni ubytków. Wynika to prawdopodobnie z nierównomiernego ścierania powierzchni polietylenu UHMWPE, co sprawia, że przy stosunkowo niewielkiej średniej szorstkości ścieranej powierzchni pojawiają się na niej pojedyncze głębokie bruzdy widoczne w mikroskopie sił atomowych (RYS.2). Jest to wyraźnie widoczne w testach trybologicznych z użyciem metalowego bolca, a mniej wyraźnie, gdy używano metalowego pierścienia. Takie wyniki eksperymentów można tłumaczyć lokalnym występowaniem w procesie ścierania efektów adhezyjnych i czynnika zmęczeniowego. Jak wynika z TABEL 2 i 3 w wyniku tarcia na powierzchnie polietylenu dochodzi do uwalniania z niej małych (10-100 µm) i średnich (100-500 µm) cząsteczek polietylenu, z których większość ma kształty zaokrąglone. Nawiązując do tych wyników można stwierdzić z dużym prawdopodobieństwem, że średnie (100-500 µm) i małe cząsteczki polietylenu, znajdowane we wszystkich przypadkach aseptycznego obluzowania endoprotez [1] sa rezultatem zwiększonego oddziaływania trybologicznego, głównie w sytuacjach, gdy zwilżanie miejsca kontaktu jest zmniejszone, lub zredukowane do zera, nawet na bardzo krótki okres czasu. Można również z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że widoczne często w tkankach okołoprotezowych duże (2-3mm) i nieregularne cząsteczki polietylenu powstają raczej w rezultacie odłamania ich od panewki, niż w wyniku normalnego zużycia trybologicznego.

Należy też zwrócić uwagę na widoczne w testach trybologicznych zużycie metalowego bolca, wyraźne zwłaszcza w środowisku suchym. Powstające bowiem w wyniku tarcia drobne cząsteczki metalu, widoczne również w obrazach histologicznych tkanek okołoprotezowych, znajdując się w strefie bezpośredniego kontaktu metalu z polietylenem mogą powodować zwiększone zużycie panewki polietylenowej i powstawanie dużej ilości małych cząsteczek polietylenu, wpływających drażniąco na otaczające tkanki.

Wnioski

BICMATERIALOW

1) Zużycie trybologiczne polietylenu UHMWPE zależy od warunków zwilżania i wzrasta wyraźnie w warunkach tarcia suchego.

2) W wyniku zużycia trybologicznego UHMWPE powstają małe(10-100mm) i średnie (100-500 μ m) cząsteczki polietylenu o zaokrąglonych kształtach.

Discussion

Tribological degradation of UHMWPE by metal counterbody is very sensitive to changes of lubrication. The degradation is rising steeply under dry friction as shown by the amount of produced UHMWPE debris, especially by ring load, as well as by the wear at the top of pins. Debris particles of diameter larger than 10µm were found to be mainly round-shaped. The number of irregularly shaped particles increased in water for both types of load.

In the case of pin load in NaCl solution the number of collected UHMWPE particles is surprisingly high compared to the number found for pin load in water. This may be due to the fact that we collected only the particles with sizes larger than 10 μ m. Total amount of collected debris changes when the size of small particles at the 10 μ m threshold changes, i.e. in the case of pin load in NaCl solution the sizes of small particles are slightly greater than in the case of water lubrication.

Wear tracks topography studies show lack of correlation between surface roughness and maximum height of degradation damages. The interpretation of these results is not easy because of large local changes. This reflects dynamics of the degradation process: although the mean roughness in the case of dry pin load is rather small, locally big damages occur which may be due to sticking effects as well as fatigue failure.

TABLES 2 and 3 show that small (10-100 μ m) and medium (100-500 μ m) particles are released during friction, most of them being round-shaped. Therefore it can be assumed with high probability that medium and small polyethylene particles which were found in all cases of aseptic implant loosening result from the increasing cup degradation, mainly in situations where lubrication is reduced or lost, perhaps only for a short moment. This result suggests also that large polyethylene particles (2-3 mm) result from the breakdown of the acetabulum rather than from normal tribological degradation.

In addition, degradation of the pin surface by local wear (as indicated by metallic fragments found in resected tissues [1]) has to be taken into account because such damages may produce a large number of small debris particles of the polyethylene acetabulum, causing tissue reaction.

Conclusions

1) Tribological wear of UHMWPE polyethylene depends on lubrication conditions and increases significantly in dry environment.

2) Main wear product of UHMWPE polyethylene consists of small (10-100 $\mu m)$ and medium (100-500 $\mu m)$ rounded particles.

Piśmiennictwo

References

[1]. Rudzki Z., Otfinowski J., Stachura J.: The Histological Appearence of the Periprosthetic Capsule in Failed Total Hip Arthroplasty Differs Depending on the Presence of Polyethylene Acetabulum Destruction, Iliac Bone Damage and Presence of Infection. Pol. J. Pathol., 47, (1996), s. 19-25

[2]. Schulte R.: Tribometrie von Biomaterialien in der Gelenkprothetik. Diplom Thesis. Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany, (1996)

[3]. Möllerberndt G. J.: Tribometrie von Gold und Titan beschichteten Stählen, DIN X90CrMoV18 und DIN X10CrNiTi18.9. Diplom Thesis. Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany, (1992) OCENA WPŁYWU ELEKTROSTYMULACJI ZROSTU KOSTNEGO NA PROCES KOROZJI IMPLANTÓW ZE STALI Cr-Ni-Mo

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

Zakład Inżynierii Materiałów Biomedycznych Politechniki Śląskiej w Gliwicach

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem różnych metod elektrostymulacji zrostu kostnego na przebieg korozji implantów ze stali AISI 316L, pokrytych warstwą pasywną. Elektrostymulację przeprowadzano przez 28 dni w płynie fizjologicznym Tyrode'a o temperaturze 36,6±1°C, pH zmiennym w przedziale 7,6 - 8,6. Do elektrostymulacji stosowano prąd stały o natężeniu 40 "A. Przebieg korozji badano przez pomiar ubytków masy implantów oraz ocenę uszkodzeń korozyjnych powierzchni.

Słowa kluczowe: implanty, stal AISI 316L, elektrostymulacja zrostu kostnego, traumatologia.

Wprowadzenie

Lansowane obecnie zewnętrzne metody stabilizacji odłamów kostnych, do których zaliczyć można ZESPOL i PO-LFIX, charakteryzują się elastycznością zespolenia. Ten sposób osteosyntezy umożliwia przemieszczanie się odłamów kostnych w dopuszczalnym klinicznie przedziale (poniżej 3 mm) i ogranicza jednocześnie wielkość powstałych w wyniku docisku odłamów naprężeń do 4 N/mm² [1]. Zespolenie takie prowadzi do aktywizacji zrostu kostnego dzięki wykorzystaniu efektów elektro-mechanicznych, polegających na generacji potencjałów elektrycznych w następstwie przyłożonego obciążenia, to z kolei powoduje przepływ prądów czynnościowych przez obszar złamania. Przepływ prądu wymusza transport substancji mineralnych, przyczyniając się w ten sposób do aktywizacji zrostu kostnego. Dotychczas przyjmuje się najczęściej, że efekt piezoelektryczny jest zjawiskiem wstępnym, a proces elektrokinetycznego przepływu jest mechanizmem bezpośrednio odpowiedzialnym za generację potencjałów elektrycznych w mokrej kości zbitej [2].

Badania eksperymentalne i kliniczne nad elektrostymulacją osteogenezy z wykorzystaniem prądów jednokierunkowych: stałych lub zmiennych wykazały, że tworzenie tkanki kostnej obserwowane jest zwłaszcza w pobliżu katody [3], chociaż osteogenezę stwierdzano również w pobliżu anody [4]. Elektrostymulacja zrostu kostnego wskazana jest w przypadku stanów patologicznych w postaci stawów rze-

.........

EVALUATION OF INFLUENCE OF THE BONE UNION ELECTROSTIMULATION ON CORROSION PROCESS OF THE IMPLANTS MADE OF Cr-Ni-Mo STEEL

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL MATERIALS ENGINEERING SILESIAN TECHNICAL UNIVERSITY IN GLIWICE

Abstract

The investigations on the influence of different methods of electrostimulation of the fractured bone union on corrosion of implants made of AISI 316L steel with a passive layer have been presented. The electrostimulation process was carried out for 28 days in physiological Tyrode's solution at the temperature of $36.6 \pm 1 \,^{\circ}$ C and pH changing in the range 7.6-8.6. Direct current of 40 µA intensity was used for electrostimulation. The progress of corrosion was followed by measuring implant mass losses and by evaluating corrosion damages of the implant surfaces. **Key words:** implants, AISI 316L steel,

electrostimulation of bone union, traumatology

Introduction

Currently used methods of external stabilisation of bone blocks, such as ZESPOL and POLFIX, are characterised by elastic union. This way of osteosynthesis enables moving of the bone blocks in the clinically permissible range under 3 mm and reduces stresses to the value of 4 N/mm² [1]. Such system stimulates bone union owing to electromechanical effects, which generate electrical potentials as a consequence of loading, and induce flow of action currents through the fracture area. The flow of current causes transport of mineral substances that activate the bone union. Until now it has been accepted, that piezoelectric effect is the primary phenomenon, and electrokinetic flow is the mechanism directly responsible for the generation of electric potentials in the wet cortical bone [2].

Experimental and clinical investigations on electrostimulation of osteogenesis with the use of unidirectional direct or alternating currents showed, that the formation of bone tissue is observed especially near the cathode [3], however osteogenesis has been stated also near the anode [4]. Electrostimulaton of bone union is advisable in pathological states in the case of false joint, delayed adhesions, osteoporosis and others. It should be emphasised that electrostimulation is purposeful in the initial stage of healing of fractures when therapeutic rehabilitation of the area of trauma is impossible or difficult. As it is known, natural electromechanical processes are initiated during the theraI MATERIALOW

komych, zrostów opóźnionych, osteoporozy spowodowanej niedociążeniem i innych. Należy jednak zaznaczyć, że elektrostymulacja jest celowa w początkowej fazie leczenia złamań, gdy usprawnianie obciążeniowe miejsca urazu jest niemożliwe lub utrudnione. Jak wiadomo w okresie usprawniania inicjowane są naturalne procesy elektromechaniczne.

Analizując wyniki prowadzonych badań można stwierdzić, że różnice w interpretacji uzyskanych wyników, wynikają z faktu stosowania różnych metod i parametrów elektrostymulacji. Próbę wyjaśnienia optymalnych warunków elektrostymulacji podjeli H. i J. Deszczyńscy [5], wykorzystując do stymulacji zrostu kostnego różnymi metodami prąd stały. Wyniki zrostu kostnego oceniano, stosując badania makroskopowe, radiologiczne, histologiczne i wytrzymałościowe. Istotne różnice w odbudowie tkanki kostnej obserwowano po 3 tygodniach elektrostymulacji. Osteogeneza pobudzana prądem stałym przebiegała szybciej, a powstała kostnina wykazywała większy stopień rozwoju strukturalnego oraz lepszą wytrzymałość na rozciąganie. Niekorzystnymi objawami były gromadzenie się nowopowstałej tkanki głównie wokół katody, ubytki tkanki wokół anody przy elektrostymulacji metodą inwazyjną oraz przebarwień jej okostnej. Autorzy nie analizowali procesu korozji implantów metalicznych.

Badania Marciniaka i Szczurka [6, 7] wykazały, że w konsekwencji rozwoju korozji powstaje w pobliżu implantu torebka łącznotkankowa z odczynami fagocytarnymi i pomnażaniem włókien kolagenowych, ich szkliwienie oraz metaloza. W tkankach organów miąższowych (wątrobie) jony metali wbudowują się do białek cytoplazmy hepatocytów, powstają zaburzenia w enzymach utleniających, wskutek czego następuje wzrost zawartości glikogenu prowadzący do stłuszczenia wątroby.

Kontrowersyjny więc problem korzyści wypływających ze stosowania elektrostymulacji zrostu kostnego wymaga szczegółowego wyjaśnienia od strony możliwych procesów korozyjnych zachodzących na elektrodach. Temu właśnie celowi podporządkowane zostały badania.

Materiał i metodyka

W przeprowadzonych badaniach bazowano na następujących metodach elektrostymulacji zrostu kostnego:

1. nieinwazyjnej, polegającej na wykorzystaniu dwu elektrod zewnętrznych, które przykładano do skóry po dwóch przeciwległych stronach szczeliny złamania,

2. półinwazyjnej, w której wykorzystywano elektrodę wewnętrzną (katodę) oraz zewnętrzną (anodę), umieszczone po przeciwległych stronach szczeliny złamania,

3. inwazyjnej, która z kolei wymaga zastosowania dwóch elektrod wewnętrznych, za pomocą których doprowadzano prąd do obszaru złamania.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu elektrostymulacji prądem stałym na:

1. implant z warstwą pasywną znajdujący się w obszarze, przez który przepływa prąd, jak w metodzie elektrostymulacji nieinwazyjnej,

 układ dwóch implantów z warstwą pasywną posiadających kontakt elektryczny, jak w metodzie nieinwazyjnej,
 układ implantów z warstwą pasywną, z których jeden sta-

nowił elektrodę (katodę), jak w metodzie półinwazyjnej, 4. układ implantów z warstwą pasywną stanowiących jednocześnie elektrody, jak w inwazyjnej metodzie elektrostymulacji.

W badaniach wykorzystano próbki walcowo-płaskie ze stali AISI 316L o ustalonych cechach geometrycznych. Materiał wyjściowy stanowiły pręty. Powierzchnia próbek była szlifowana mechanicznie, polerowana elektrolitycznie i spasywowana chemicznie wg metody opracowanej przez autorów [8]. peutic rehabilitation.

On analysing the results of investigations one can find out that differences in their interpretation are connected with the use of different methods and parameters of electrostimulation. Using the direct current for stimulation of bone union in different methods, H. and J. Deszczyński [5] tried to find explanation of optimal electrostimulation conditions. The results were evaluated by microscopic, radiological, histological and mechanical examination. Significant differences in reconstruction of bone tissue were observed after 3 weeks of electrostimulation. Osteogenesis stimulated by direct current proceeded faster, the callus formed showed better structural development and higher tensile strength. Accumulation of the newly formed tissue mainly around the cathode, losses of tissue around the anode during the invasive electrostimulation and colour changes of periosteum were the unfavourable symptoms. The authors didn't analyse corrosion of metallic implants.

According to Marciniak and Szczurek [6,7] as a consequence of corrosion, connective tissue capsules with the phagocyte reactions and multiplication of collagen fibres are formed near the implant, their glazing and metalosis are also obseved. In the tissues of detoxicating organs (liver), metal ions build into hepatocyte cytoplasm proteins, functioning of the oxidising enzymes is disturbed and therefore the amount of glycogen increases, leading to the fatty degeneration of liver.

Controversial problem of advantages resulting from the use of electrostimulation of bone union requires a detailed explanation basing on the observation of corrosion processes occurring on the electrodes. The investigations presented in this paper relate to this aim.

Material and experimental

The following methods of electrostimulation of bone union were used:

- 1. non-invasive, in which two external electrodes were attached to skin on two opposite sides of the fracture gap,
- half-invasive, with one internal electrode/cathode/ and external/anode/ placed on the opposite sides of the fracture gap,
- 3. invasive, in which two internal electrodes supplied current to the fracture area.
- The purpose of investigations was to determine the influence of direct current electrostimulation on:
- implant with a passive layer situated in the area of current flow, as in the non-invasive electrostimulation method,
- system of two implants with a passive layer having electrical contact, as in the non-invasive method,
- system of implants with a passive layer, of which one was the electrode (cathode), like in the half-invasive method,
- system of implants with a passive layer being simultaneously electrodes, like in the invasive electrostimulation method.

Flat cylindrical specimens of AISI 316 steel of determined geometrical features were used in the investigations. The specimen surface was prepared by mechanical grinding, electrolytic polishing and chemical passivation according to the method worked out by the authors [8].

MATERIALOW

Stanowisko badawcze

W celu przeprowadzenia badań zostało opracowane i wykonane stanowisko badawcze, umożliwiające przeprowadzenie elektrostymulacji różnymi metodami w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Schemat ideowy stanowiska badawczego przedstawia RYS. 1.

Główny element stanowiska badawczego stanowiła kuweta wypełniona wodą, w której znajdowało się dziewięć specjalnie zaprojektowanych pojemników wypełnionych płynem Tyrode'a z zanurzonymi w nim próbkami. W kuwecie znajdował się ponadto termostat umożliwiający przeprowadzenie badań w określonej temperaturze. Do elektrostymulacji wykorzystano specjalnie do tego celu przystosowany elektrostymulator ASTYM firmy Astar ABR o określonych programach zabiegowych, generujących różne przebiegi prądowe: diadynamiczne (MF, DF, CP, CP-ISO, LP), impulsowe (trójkątny i prostokątny), ultra Reitz, galwaniczne (klasyczne i przerywane). Natężenie prądu można było regulować w zakresie 0-100 µA. W celu zapewnienia jednakowych warunków prądowych stymulacji w każdym pojemniku próbki połączono szeregowo z biegunami elektrostymulatora za pomoca elektrod.

Laboratory stand

The laboratory stand worked out for electrostimulation by different methods in the conditions similar to the physiological ones is shown schematically in FIG.1. The main element of that stand was a cuvette with ten specially designed containers filled with Tyrode's solution. Specimens were immersed in it. To ensure constant temperature of the experiments, the cuvette was thermostated. Electrostimulation process was carried out using a specially adapted ASTYM electrostimulator Astar ABR with a software enabling generation of different current courses: diadynamic (MF,DF,CP-ISO,LP), impulse (triangular and rectangular), ultra Reitz, galvanic (classical and interrupted). Current intensity was controlled in the range 0-100 µA. Series connection of the containers with the electrostimulator poles was applied in order to ensure identical current conditions of electrostimulation for all the specimens. The containers in the cuvette were divided into three parallel sections. Each section represented a different variant of experiment.



Pojemniki w kuwecie zostały podzielone na trzy równoliczne sekcje. Każda z sekcji reprezentowała inny wariant badań.

Sekcja 1 służyła określeniu wpływu elektrostymulacji nieinwazyjnej na implant znajdujący się w obszarze przepływającego prądu galwanicznego. Do tego celu wykorzystywano pojemnik - RYS. 2. W celu doprowadzenia prądu zastosowano elektrody platynowe (1) umieszczone w końcach pojemnika, oddzielone od przestrzeni, w której znajdowały się próbki (2) membranami jonoselektywnymi (3). Membrany te uniemożliwiały migrację jonów aktywnego chloru. W ścianach bocznych pojemnika znajdowały się odpływy przelewowe (4), dzięki którym utrzymany był stały poziom płynu Tyrode'a oraz określona wartość pH roztworu.

Sekcja 2 służyła do określenia wpływu elektrostymulacji na układ dwóch implantów będących w kontakcie elektrycznym. Wariant ten odpowiadał elektrostymulacji nieinwazyjnej, w której to pomiędzy zewnętrznymi elektrodami znajdowały się dwa implanty będące w kontakcie elektrycznym. Sposób doprowadzenia prądu oraz zastosowany pojemnik były analogiczne jak w sekcji 1.

Dyly analogiczne jak w sekc

Sekcja 3 reprezentowała inwazyjną i półinwazyjną metodę elektrostymulacji. Elektrodami w tej metodzie były próbki. Wariant ten odpowiadał elektrostymulacji, wykorzystującej jako elektrody dwa najbliższe wkręty kostne, usytuowane po przeciwnej stronie szczeliny złamania - (metoda inwazyjna) lub wykorzystanie tylko jednego wkreta kostnego, jako katody wraz z elektrodą zewnętrzną (anodą), umieszczoną na skórze po przeciwnej stronie szczeliny złamania. W sekcji tej prąd doprowadzany był bezpośrednio do próbek, a zastosowany pojemnik nie posiadał membran jonoselektywnych.

kostnego, z elektro-(anodą), skórze po e szczeliny cji tej prąd ył bezpoc, a zastonie posiaoselektyw-KYS. 2. Pojemnik wraz z próbkami wykorzystywany w sekcji 1. FIG. 2. Container with specimens used in section 1.

W skład stanowiska wchodziła również pompa perystaltyczna, która dostarczając do pojemników z trzeciego wariantu świeży roztwór fizjologiczny zapewniała określoną wartość pH. Stanowisko wyposażone było ponadto w mierniki elektryczne oraz pH-metr, umożliwiające stałą kontrolę odpowiednio natężenia przepływającego prądu oraz stężenia jonów wodorowych.

Omówione stanowisko badawcze dzięki swej konstrukcji oraz zastosowanym urządzeniom umożliwiało przeprowadzenie badań przy stałych wartościach temperatury, natężenia prądu oraz zmieniającej się w ściśle kontrolowany sposób wartości pH roztworu.

Elektrostymulacja z wykorzystaniem próbek z warstwą pasywną trwała 28 dni. Była przeprowadzana w sposób ciągły (24h/dobę), jednakże periodycznie przerywana co 7 dni. Po każdym 7-dniowym cyklu ważono próbki z dokładnością 10⁻⁴ g oraz obserwowano ich powierzchnię. W badaniach wykorzystano 18 próbek (po 6 w każdej sekcji). Badania przeprowadzono przy następujących parametrach:

- prąd galwaniczny o natężeniu i = 40 ± 0,5 μA,
- temperatura roztworu Tyrode'a T = $36.6 \pm 1^{\circ}$ C,
- pH roztworu zmienne w zakresie 7,6 8,6,
- odległość pomiędzy próbkami 40 mm.

Odległość pomiędzy próbkami wynosząca 40 mm odpowiada najmniejszemu rozstawowi stabilizatora w systemie stabilizacyjno-manipulacyjnym POLFIX. Section 1 was designed to determine the influence of non-invasive electrostimulation on implant situated in the area of galvanic current flow. For this purpose a container showed in FIG.2 was used. Current was supplied by platinum electrodes (1) placed at the ends of the container and separated by ionoselective membranes (3) from the space where the specimens (2) were kept. The membranes prevented migration of the active chloride ions. On the side wall of the container there were overflow outlets (4), which enabled maintaining of stable level of Tyrode's solution and specific pH value.

Section 2 was used to determine the influence of electrostimulation on the system of two implants remaining in electrical contact. This variant corresponded to the noninvasive electrostimulation where between the external electrodes there were two implants remaining in electrical contact. The current supply and container were analogous as in section 1.

Section 3 represented the invasive and half-invasive method of electrostimulation. In this method specimens were

the electrodes. This variant was related to electrostimulation in which two nearest bone screws were used as electrodes, situated on the opposite sides of fracture gap - (invasive method) or only one bone screw was used as a cathode together with an external anode placed on the skin on the opposite side of fracture gap. In this section, current was supplied directly to the specimens and the container used was not equipped with the ionoselective membranes.

A peristaltic pump which maintained stable pH value by supplying fresh physiological solution to the containers of third variant was

also a part of the laboratory stand. Moreover, the stand was equipped with electric meters and pH-meter enabling continuous control of current intensity and hydrogen ion concentration, respectively.

The laboratory stand, owing to its construction and devices used, allowed for carrying out the investigations at constant temperature, current intensity and pH of the solution varying in a precisely controlled way.

Electrostimulation with the use of specimens with a passive layer lasted 28 days. It was carried out continuously (24 h day and night) with interruption every 7 days. After each 7 - day cycle the specimens were weighed with an accuracy of 10⁻⁴ g and their surface was examined.

18 specimens (6 in each section) were used. Investigations were carried out at the following parameters:

- galvanic current intensity i = 40 + 0.5 μ A,
- temperature of Tyrode's solution T = $36.6 \pm 1^{\circ}C$,
- solution pH varying in the range 7.6 8.6,
- distance between specimens 40 mm.

Distance between specimens equal 40 mm corresponds to the smallest spacing of stabilisers in the fixation-manipulation POLFIX system.

ziła również pompa perystalpojemników z trzeciego waequipped with electric m



Wyniki badań

Na podstawie pomiarów masy próbek, wykonanych w odstępach 7 dniowych nie stwierdzono zmiany masy próbek wykorzystywanych w 1 i 2 sekcji.

Obserwacje makroskopowe stosowanych próbek po 7 dniach elektrostymulacji ujawniły na powierzchni miejscowe wytrawienia. Powierzchnia ta powiększała się z upływem czasu, jednakże po upływie 28 dni elektrostymulacji stanowiła znikomą część powierzchni próbki (około 0,5 %). Miejsca wytrawień znajdowały się najczęściej w pobliżu krawędzi próbki -RYS.3. Opisane zmiany miały charakter wyłącznie powierzchniowy.

Dla próbek wykorzystywanych jako katody w półinwazyjnej i inwazyjnej metodzie elektrostymulacji zrostu kostnego (sekcja 3) nie stwierdzono zmiany masy. Na ich powierzchni obserwowano wytrawienia, których wielkość, lokalizacja oraz charakter były analogiczne jak uprzednio.

Na powierzchni próbek stanowiących anody w elektrostymulacji zrostu kostnego metodą inwazyjną, obserwowano obecność produktów korozji w formie zwartej czaszy, zlokalizowanej nad powstającym wżerem. Uszkodzenia korozyjne powierzchni anody stosowanej w metodzie inwazyjnej zrostu kostnego po usunięciu produktów korozji przedstawiają RYS.4 i 5.

Zmiany wielkości ubytków masy próbek w funkcji czasu dla elektrostymulacji metodą inwazyjną przedstawia

Results

Basing on the measurements of specimen mass carried out in 7-day intervals no mass changes were observed for the specimens used in sections 1 and 2.

Macroscopic observations of the specimens after 7 days of electrostimulation revealed local etched areas on their surface. Those areas grew with time but after 28 days of electrostimulation they covered only about 0.5 % of the overall specimen surface. The etched areas were situated more often near the edges of specimens - FIG. 3.

The described changes occurred on the surface only.

Mass changes were not stated for the specimen used as a cathode in the half-invasive and invasive method of electrostimulation of the fractured bone union (section 3). Etched areas which size, localisation and character were analogous to the above-described, were observed on the surface.

On the specimen surfaces being the anodes in electrostimulation of the fractured bone union by the invasive method, there were corrosion products in the form of compact nodules. Corrosion damages of the anode surface in the invasive method of the fractured bone union after removal of the corrosion products are shown in FIGS. 4 and 5.

Mass losses of specimens as a function of time for the invasive method of electrostimulation are shown in FIG. 6.



RYS. 3. Miejscowe wytrawienia powierzchni próbki po 28 dniach elektrostymulacji (SEM, 500x).

FIG. 3. Local etched area of specimen surface after 28 days of electrostimulation (SEM, 500x). RYS. 4. Widok wżeru na powierzchni anody po 28 dniach elektrostymulacji (SEM, 500x)

FIG. 4. Corrosion pits on the anode surface after 28 days of of electrostimulation (SEM, 500x). RYS. 5. Widok wżerów na powierzchni anody po 28 dniach elektrostymulacji (SEM, 800x).

FIG. 5. Corrosion pits on the anode surface after 28 days of electrostimulation (SEM, 800x).

RYS. 6. Na rysunku tym linią ciągłą zaznaczono zależność zmiany masy próbek w funkcji czasu, wynikającą z prawa Faraday'a. Wartość stałej elektrochemicznej dla materiału, z którego wykonane zostały próbki, wynosiła k=0,952 g/Ah. Ponadto w formie prostokątów uwzględnione zostały błędy z poszczególnych punktów pomiarowych. The figure presents also the time-dependence of mass changes of specimens, calculated from the Faraday law (a continuous line). The value of electrochemical constant, k, for the material of which the specimens were made, was k=0.952 g/Ah. The measuring errors at each experimental point are given in the form of rectangles.



ss a ne ns ve e

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące uogólnienia:

1. elektrostymulacja zrostu kostnego metodą nieinwazyjną nie powoduje zmian masy próbek oraz masy w układzie próbek z warstwą pasywną znajdujących się w obszarze, przez który przepływał prąd. Charakter zaobserwowanych zmian na powierzchni próbek wskazuje, że metoda ta może być stosowana do elektrostymulacji zrostu kostnego. Obserwowane miejscowe wytrawienia powierzchni próbek z ewentualnymi ubytkami masy mieszczą się poza zakresem czułości stosowanej metody pomiarów ubytków masy

 brak ubytków masy z próbek z warstwą pasywną, wykorzystywanych jako katody w półinwazyjnej metodzie elektrostymulacji zrostu kostnego oraz minimalne miejscowe zmatowienie powierzchni próbek wskazuje na przydatność również tej metody do elektrostymulacji zrostu kostnego.

3. stosowanie elektrostymulacji zrostu kostnego metodą inwazyjną powoduje ubytki masy anody, zgodne co do wielkości z prawem Faraday'a. Elektrostymulacja zrostu kostnego tą metodą może prowadzić do rozwoju metalozy. Z tych względów stosowanie stymulacji zrostu kostnego prądem stałym metodą inwazyjną jest niedopuszczalne dla elektrod pokrytych warstwą pasywną.

Piśmiennictwo

[1]. Ramotowski W.: Stabilizatory płytkowe Zespol i Polfix, Agencja Wydawnicza "Zebra", Kraków 1998.

[2]. Uklejewski R.: O efektach elektromechanicznych w porowatej kości długiej. Prace IBiIM, 1994, nr 35.

[3]. Zicher L.: Elektrostimulation des Knoches. Eine tierexperimentelle und klinische Studie. Enke Verl., Stuttgart 1984.
[4]. Cieszyński T.: Bioelektryczne pobudzanie regeneracji tkanki kostnej u ludzi w przypadkach opóźnienia zrostu kostnego i stawów rzekomych. Chir. Narz. Ruchu Ortop. Pol. 1979, XXXV, 4, s. 507-511.

ELEKTROCHEMICZNE I KOROZYJNE WŁAŚCIWOŚCI TI6AL4V ELI W ROZTWORACH KWASU FOSFOROWEGO

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

Instytut Inżynierii Produkcji i Materiałoznawstwa Politechniki Zielonogórskiej

Streszczenie

Barierowa warstwa tlenkowa wytworzona na powierzchni metalu podczas elektrochemicznej obróbki anodowej implantowych stopów tytanu w roztworach kwasu fosforowego posiada właściwości stymulujące procesy osseointegracji w środowisku biologicznym. W pracy przedstawiono badania wczesnych etapów anodowania stopu tytanu Ti6Al4V ELI w wodnych roztworach kwasu fosforowego o różnym stęże-

Conclusions

The investigations carried out in this work allow for the following generalisations:

1. Electrostimulation of bone union by a non-invasive method doesn't cause any changes of specimen mass. The same is true for the specimens with a passive layer situated in the area of current flow. The character of changes observed on the specimen surface indicates that this method can be used for electrostimulation of bone union. Mass changes connected with the observed local etched areas on the surface of specimens are within the range measuring error.

2. Lack of mass losses for the specimens with a passive layer, used as cathodes in the half-invasive method of electrostimulation of bone union and minimal local tarnishing of specimen surface also indicates the usefulness of this method for electrostimulation of bone union.

3. Electrostimulation of bone union by the invasive method causes mass losses of the anode proceeding in agreement with Faraday's law. Electrostimulation of bone union by this method can lead to metalosis. For this reason, stimulation of bone union with direct current by the invasive method is inadmissible for electrodes covered with a passive layer.

References

[5]. Deszczyńska H., Deszczyński J.: Metody stymulacji prądem stałym świeżych złamań kości promieniowych w doświadczeniach na królikach. Praca doktorska Akademii Medycznej w Warszawie, 1982.

[6]. Marciniak J.: Stabilizatory do zepoleń dociskowych kości. Projekt badawczy KBN nr 4 1738 91 01. Politechnika Śląska "Gliwice 1991/94.

 [7]. Szczurek Z., Marciniak J., Koczy B., Myrcik H.: Ocena biotolerancji implantów ze stali Co-Ni-Mo. Mater. Konf. Biomechaniki, Gdańsk 1987, s. 537-541.
 [8]. Patent RP nr P 314 703.

ELECTROCHEMICAL AND CORROSION PROPERTIES OF TI6AL4V ELI IN PHOSPHORIC ACID SOLUTIONS

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

INSTITUTE OF PRODUCTION ENGINEERING AND MATERIALS SCIENCE, TECHNICAL UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA

Abstract

Barrier oxide films formed by electrochemical anodic treatment of implant titanium alloys in phosphoric acid solutions influence advantageously the stimulation of osteointegration processes in human body. The investigations of early stages of the Ti6Al4V ELI alloy oxidation in aqueous solutions of phosphoric acid of different concentrations are presented. The use of potentiodynamic and galvanostatic polarisaniu. Zastosowane techniki polaryzacyjne - potencjodynamiczna i galwanostatyczna - wykazały możliwość potwierdzenia na drodze elektroanalitycznej udziału jonów fosforanowych w procesie anodowania.

Słowa kluczowe: Ti6Al4V, anodowanie, krzywe polaryzacyjne

Wprowadzenie

Korzystne cechy mechaniczne oraz wysoka odporność korozyjna tytanu i jego stopów stale poszerzają możliwości ich stosowania w implantologii. Towarzyszą temu intensywne prace nad ograniczeniem degradacji elementów podlegających zużyciu kontaktowemu [1-3] przez nakładanie warstw TiO₂ i TiN [4,5], diamentopodobnych [6], hydroksyapatytowych [7] za pomocą technik implantacji jonowej [8], plazmowych, laserowych CVD, PVD, zol-żel [9-11], a także zabiegów pasywacyjnych. Ich efektem są powłoki nie zawsze jednorodne, o zróżnicowanej grubości, szczelności i przyczepności, oraz zmienionej strukturze podłoża w wyniku oddziaływania temperatury obróbki.

Znaczna odporność korozyjna tytanu i jego stopów, wynika głównie z właściwości barierowych warstwy tlenkowej. Utworzona na powierzchni metalu w powietrzu, także w temperaturze podwyższonej do 400°C, składa się przede wszystkim z TiO₂, oraz Ti₃O₅, Ti₂O₃ i TiO [12] i jest warstwą niejednorodną, o małej grubości, pozbawioną naprężeń. Uzyskanie grubszej warstwy tlenkowej na Al, Nb, Zr, Ge, Si oraz Ti, metodą anodowania [13-18], wymaga uwzględnienia wielu czynników kształtujących jej strukturę i morfologię, w tym: stanu powierzchni stopu, składu chemicznego, pH, temperatury i przepływu elektrolitu oraz parametrów i rodzaju polaryzacji.

Elektrochemiczne utlenianie metali zachodzić może dwojako zależnie od stężenia elektrolitów:

w roztworach rozcieńczonych

nMeO+ mH₂O \rightarrow Me_nO_m + 2mH⁺ + 2me⁻ (1) w roztworach stężonych Me + X⁻ⁿ \rightarrow MeX^{-(n-m)} + me⁻ (2)

O kinetyce ich przebiegu, zdaniem Hoara [19] i Heuslera [20], decydują stosunki molowe adsorbowanych anionów i wody przy powierzchni anody. Warunkiem uzyskania w trakcie anodowania pożądanych właściwości barierowych warstwy jest osiągnięcie stanu równowagi dynamicznej pomiędzy szybkością narastania tlenku, a anodowym rozpuszczaniem metalu. Jednak oddziaływanie typowych utleniaczy do anodowania (H₂SO₄, HCl, H₃PO₄, HNO₃ i HBO₃) z dodatkami w roztworach wodno-organicznych o różnych stężeniach, konkurując z agresywną zdolnością rozpuszczania metali daje często warstwę stosunkowo grubą, ale porowatą [13, 22].

Jednym z efektywnych, choć mniej poznanych elektrolitów do anodowania jest kwas ortofosforowy H₃PO₄. Wyższe krytyczne gęstości prądu pasywnego tytanu w tym środowisku wskazywały według Singha [21] na mniejsza korozyjność H₃PO₄ w porównaniu do HCl i H₂SO₄, co wyjaśniano większą zdolnością adsorpcyjną jonów PO4-3 niż SO4-2, a przez to ich udziałem w reakcji rozpuszczania i modyfikacji powierzchni stopów tytanu. Odpowiada to następującej kolejności elektrolitów NaOH > Na2SO4 > HCIO4 > HNO3 > $HCl > H_3PO_4 > H_2SO_4$, uporządkowanych przez Mazhara i wsp.[24] według zdolności pasywacji tytanu, w której tylko kwas siarkowy ustępuje fosforowemu. Zalecane w literaturze [13-18] różne rodzaje polaryzacji: galwanostatyczna, potencjostatyczna i kombinowana, budzą wątpliwości co do stosowania wysokich napięć wobec doniesień Dyera i Leacha [23] o łatwym przebiciu krystalicznej warstwy tlenkowej charakterystycznej dla wysokonapieciowych warunków anodowania. Według Ohtsuki i wsp. [24] oraz Shibaty i Zhu [25] już powyżej 6-7,5 V następowały zmiany struktury tlen-

.....

tion techniques revealed the possibility to confirm the electrochemical incorporation of phosphate ions into the surface oxide layer of the alloy.

Key words: Ti6Al4V ELI, anodising, phosphoric acid, polarisation.

Introduction

The advantageous mechanical properties and the high corrosion resistance of titanium and its alloys continually increase their use for surgical purposes. This is accompanied by intensive research to reduce degradation of elements exposed to contact wearing [1-3] by means of TiO_2 and TiN [4,5], diamond-like carbon [6] and hydroxyapatite [7] coatings applied by ion implantation [8], plasma, laser, CVD, PVD and sol-gel [9-11] techniques as well as passivation treatments. The obtained coatings are very often non- uniform, have irregular thickness, porosity, adherence, which is accompanied by microstructural changes of the matrix due to the high temperature treatment.

The excellent corrosion resistance of titanium and its alloys is based on the barrier properties of the surface oxide layer. When formed spontaneously in air, even at the temperature raised to 400°C, it consists mainly of TiO₂ and Ti₃O₅, Ti₂O₃, TiO [12], and forms a thin layer without stresses. Thicker oxide layers on Al, Nb, Zr, Ge, Si and Ti, obtained by anodisation [13-18], require considering many factors, which influence its structure and morphology, including the state of surface, composition of electrolyte, its pH, temperature and flow as well as the polarisation programme and the current-voltage parameters. The electrochemical oxidation of metals may proceed in two ways, depending on the electrolyte concentration

in diluted solutions $nMeO+ mH_2O \rightarrow Me_nO_m + 2mH^+ + 2me^$ in concentrated solutions

Me + $X^{-n} \rightarrow MeX^{-(n-m)} + me^{-n}$

(1)

MATERIALOV

According to Hoar [19] and Heusler [20], molar relations of the adsorbed anions and water at the anode surface play a crucial role in the kinetics of mentioned processes. Proper conditions for the formation of the required barrier properties of the surface film are achieved at the steady state of the system, i.e. at equilibrium between the growth of oxide and the anodic dissolution of metal. However, competition between the reactivity of typical oxidants (H_2SO_4 , HCI, H_3PO_4 , HNO₃ and HBO₃) with the additives in organic-water solutions of different concentrations and strong tendency of metals to dissolve, often produces a relatively thick but porous layer [13, 24].

One of the efficient although less known anodising medium is phosphoric acid, H₃PO₄. According to Singh [23], the higher the passive current densities in this medium, the lower the corrosion aggressiveness of this electrolyte compared to HCI and H₂SO₄. This was explained by higher adsorption ability of phosphate ions, PO4-3, compared to sulphate ions, SO4-2, and their participation in the dissolution and surface modification processes. It corresponds to the following arrangement of anodising electrolytes NaOH > $Na_2SO_4 > HCIO_4 > HNO_3 > HCI > H_3PO_4 > H_2SO_4$, proposed by Mazhar et.al. [24], where phosphoric acid is one of the weakest anodising reagents. Many different polarisation methods - galvanostatic, potentiostatic and combined ones, applied at low and high voltages are recommended in the literature [13-18]. The latter raise doubts, however, in view of the results reported by Dyer and Leach [25], according to which, crystalline passive layers - characteristic for high voltage anodising - easily break down. According to Ohtsuka et. al. [26], Shibata and Zhu [27] the transformation of amorphous titanium oxide into the crystalline one and the apparent increase of the oxide layer thickness were observed for

ków z amorficznej na krystaliczną i znaczny wzrost grubości warstwy. Istotnym przy zastosowaniu H₃PO₄ w charakterze medium do anodowania implantowych stopów tytanu jest wzmiankowana przez Kima i wsp. [26], stymulacja powstawania hydroksyapatytu na powierzchniowej warstwie utworzonej na stopach tytanu w środowisku tego kwasu.

Przedstawione w pracy badania wstępnego etapu utleniania implantowego stopu tytanu Ti6Al4V ELI w roztworach kwasu fosforowego H₃PO₄ o stężeniu 0,5-6M w zakresie potencjału nie przekraczającego 6 V zmierzały do ustalenia kinetyki anodowania i ewentualnego potwierdzenia udziału jonów fosforanowych w procesach tworzenia warstwy tlenkowej.

Badania

28

Anodowaniu poddano próbki walcowe o średnicy 6 mm i długości 15 mm ze stopu Ti-6Al-4V ELI, o składzie chemicznym zgodnym z ASTM F136, ISO 5832-3, w stanie wyżarzonym, polerowane.

Po umyciu w płuczce ultradźwiękowej i ustaleniu potencjału korozji E_{kor} próbki Ti6Al4V ELI poddawano polaryzacji galwanostatycznej przy gęstościach prądu 40, 60, 80, 100 μ A/cm² w czasie koniecznym do uzyskania plateau krzywej w 0,5-6 M H₃PO₄. Roztwory kwasu o tych samych stężeniach zastosowano też w testach potencjodynamicznych wykonywanych z szybkością 100 mV/min w zakresie potencjału od E_{kor} od 800mV do 4500 mV. Wszystkie badania wykonywano w temperaturze 298K przy użyciu zestawu elektrochemicznego ATLAS 9431 z oprogramowaniem, stosując w charakterze elektrody odniesienia nasyconą elektrodę kalomelową (NEK), umieszczoną w tym samym naczyniu elektrolitycznym (RYS.1). W każdym teście stosowano nowe próbki powtarzając eksperyment trzykrotnie dla każdych warunków.



Omówienie

IMATERIALOW

Krzywe galwanostatyczne, przedstawione przykładowo na RYS. 2. ukazują początkowo szybki wzrost potencjału w czasie związany ze zjawiskami ładowania podwójnej warstwy elektrycznej i adsorpcją składników elektrolitu na powierzchni. Na większości krzywych widać wyraźny etap liniowego wzrostu potencjału, przypisywany narastaniu tlenku na powierzchni metalu, by następnie po czasie zależnym od stężenia elektrolitu zaobserwować przejście w odcinek płaski, Przebieg ostatniego fragmentu krzywej, nie zawsze zupełnie płaski, odzwierciedlał wpływ parametrów anodowania: stężenia i gęstości prądu polaryzacji. Dla niższych gęstości prądu 20-60 μ A/cm² zanotowano ustalenie potencjału o wartości około 1800 mV vs NEK, dla wyższych gęstości 60-100 μ A/cm², zależnie od stężenia kwasu, zaobserwowano niewielki przystanek na poziomie 1800 mV

the potential higher than 6-7.5 V. The most important factor in using phosphoric acid as the anodising electrolyte for the implant titanium alloys is, after Kim et. al. [28], the ability to stimulate the formation of hydroxyapatite on the surface of oxide film produced on titanium alloy in that medium. The presented investigations of anodic behaviour of the implant alloy Ti6Al4V ELI in phosphoric acid solutions of different concentrations at the potential below 6 V were focused on determination of the kinetics of early stages of anodising treatment and electrochemical confirmation of phosphate ions incorporation into the oxide layer.

Experimental method

Cylindrical samples, 15 mm long, with a diameter of 6 mm, made of the Ti6Al4V ELI alloy with nominal composition according to ASTM F136, ISO 5832-3, were anodized. The material was annealed, ground finished and mechanically polished using emery paper of different grades, cut from the same titanium alloy rod to limit the differences in compositions. Mechanical polishing was chosen based on the reported complications arising from etching. After being ultrasonically washed, samples remained immersed in the test solutions for at least 30 min to establish the corrosion potentials E_{cor} before the anodic treatment and then, they were galvanostatically polarised in phosphoric acid solutions, using 40, 60, 80, 100 μ A/cm² current densities, up to the moment when the plateau on polarisation curve was achieved. Phosphoric acid solutions (0.5-6 mol/dm³), prepared with analytical grade H₃PO₄ and doubly distilled water, were not de-aerated. The same concentrations of solutions were chosen for potentiodynamic tests, which were carried out at the sweep rate 100 mV/min, within the potential range from E_{cor} 800 mV to 4500 mV vs the saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode. A 1000 cm³ glass cell, presented in FIG.1, without separate compartments for the auxiliary and reference electrodes was used. An ATLAS model 9431 potentiostat and universal programmer and PC with the appropriate software was used to carry out the galvanostatic and potentiodynamic experiments. Three samples were used for every test conditions.

FIG.1. Experimental cell: 1 – sample, 2 – SCE, 3 – Pt auxiliary electrode, 4 – thermometer

Results and discussion

The examples of galvanostatic curves, which are presented in FIG.2, in the case of low current densities initially showed fast voltage increase connected with charging of the double layer and adsorption of the electrolyte components on the anode surface. After that most voltage-time responses were linear and the gradual rise in potential was very likely associated with the oxide growth. Finally the voltages approached the plateaux. The shape of last curve segment and the plateau levels was related to anodising parameters: electrolyte concentration and current density. At lower densities 40-60 μ A/cm² the potential arrest at the level of ~1700-1800 mV vs. SCE was observed, at higher current densities 60-100 μ A/cm², after a short arrest at 1800 mV the potential increased again approaching the final level within the range 2600-4300 mV vs. SCE. The stable (RYS.2b, 2e), a następnie wzrost potencjału do kolejnego przystanku w zakresie 2600-4300 mV vs NEK. Ustalenie potencjału wskazywać może osiągnięcie stanu równowagi procesów utleniania i rozpuszczania metalu lub etapu przekształcania struktury i starzenia warstwy tlenkowej. Nieregularny przebieg krzywych sugeruje dominację jednego z wymienionych wcześniej procesów lub występowanie alternatywnych zjawisk w procesie anodowania. Za tym ostatnim przemawia fakt, że punkt przegięcia na poszczególnych krzywych występował tym szybciej im wyższe było stężenie kwasu fosforowego. potential value may indicate steady-state situation, i.e. equilibrium between the metal oxidation and dissolution, or may be the evidence of structural changes and ageing of the anodic film. The non-linear voltage-time responses for more concentrated electrolytes suggest domination of one of the mentioned processes or the occurrence of some alternative phenomena during the anodization. The evidence for the last argument could be the fact that the inflection point on polarisation curve occurred the faster the higher was the phosphoric acid concentration.

If the following relation between the oxide formation rate and the polarising current density is applied [27]:



a) 0,5 M H₃PO₄, 40 μ A/cm², , b) 0,5 M H₃PO₄, 100 μ A/cm², c) 1 M H₃PO₄, 60 μ A/cm², d) 1 M H₃PO₄, 80 μ A/cm², e) 2 M H₃PO₄, 60 μ A/cm², f) 4 M H₃PO₄, 60 μ A/cm²,

RYS. 2. Krzywe galwanostatyczne Ti6Al4VELI w H₃PO₄.

FIG.2. Examples of galvanostatic voltage-time responses for Ti6Al4VELI in H₂PO₄.

Jeżeli przyjąć, że szybkość tworzenia tlenku na powierzchni metalu w zależności od gęstości prądu może być według [27] wyrażona równaniem $(dE/dt) i = a (i)^{b}$ (3)to przebieg funkcji log dE/dt=loga+b logi (4)dla danych eksperymentalnych liniowego odcinka

Rodzaj elektrolitu H₃PO₄ concetration	a	b
0,5 M H ₃ PO ₄	1,99 x 10 ⁶	1,308
1 M H ₃ PO ₄	2,15 x 10 ⁶	1,236
2 M H ₃ PO ₄	6,22 x 10 ⁴	0,902
3 M H ₃ PO ₄	8,61 x 10 ⁵	1,145
4 M H ₃ PO ₄	1,37 x 10 ⁴	0,793
5 M H ₃ PO ₄	9,95 x 10 ⁵	1,185
6 M H ₃ PO ₄	3,89 x 10 ⁴	1,281

TABELA 1. Parametry a i b równania (3).TABLE 1. Parameters a and b in equation (3).

(dE/dt) i = a (i) b (3) then the straight line log dE/dt = log a+b log i (4) obtained for the experimental data of the linear segment of curve should verify the applicability of the equation (3) to investigated process of Ti6Al4V anodization in phosphoric acid solutions (0.5 -6 mol/dm³). The experiment-

29

II MATERIALOV

krzywych wykorzystany do analizy wyników może zweryfikować hipotezę o charakterze utleniania badanych próbek Ti6Al4V w roztworach kwasu fosforowego o stężeniu od 0,5 M do 6 M. Przedstawione na RYS.3 liniowe przebiegi zmian potencjałów w czasie w funkcji gęstości prądu (log dE/dt = $f(\log i_g)$ oraz wartości współczynników a i b równania (3) zestawione w TABELI 1 wykazują słuszność tezy o al results plotted in the appropriate co-ordinates (log dE/dt = f(log i_g) in FIG. 3 and the values of coefficients a and b listed in TABLE 1 confirm the hypothesis about the character of oxidation process. The values of coefficient b diminish as the acid concentration decreases reaching the smallest value for 4M H₃PO₄, then they increase for the higher acid concentrations.



RYS. 3. Wyniki badań galwanostatycznych anodowania Ti6Al4VELI w H_2PO_4 .

RYS. 4 Szybkość anodowania Ti6Al4V.

FIG. 3. Results of galvanostatic tests for anodising of Ti6Al4VELI in H,PO,.

FIG. 4. Anodising of Ti6Al4VELI in H₃PO₄.

potęgowym charakterze utleniania. Współczynnik b maleje przy obniżaniu stężenia przyjmując najmniejszą wartość dla kwasu 4M, po czym ponownie wzrasta przy wyższych stężeniach H₃PO₄.

Zdolność anodowania badanego stopu Ti6Al4V, mierzona za pomocą log dE/dt, była zdecydowanie najniższa w przypadku 4M H₃PO₄ oraz najwyższa dla kwasu o stężeniu 0,5M pod warunkiem zastosowania gęstości prądu powyżej 60 μ A/cm². Obserwacje te potwierdza i ilustruje RYS. 4, gdzie zaprezentowano zmiany potencjału przy polaryzacji prądem o gęstości 60 μ A/cm² dla stosowanych stężeń kwasu fosforowego.

Potencjodynamiczne krzywe polaryzacyjne dla próbek tytanu i Ti6Al4V przedstawione na RYS. 5, wykazują niewielki wzrost gęstości prądu w zakresie pasywnym w roztworach H₃PO₄ o stężeniach 0,5-2 M (RYS.5a). Pod tym wzgledem potwierdzają zarówno obserwacje badań galwanostatycznych, jak i przytoczone wcześniej sugestie Singha [23] o mniejszej korozyjności mediów wobec tworzyw, w których wykazują one niższe gęstości prądów pasywnych. Krzywa dla stopu polaryzowanego w 3 M H₃PO₄ (RYS.5b) wykazuje jednak odwrotną tendencję, ujawniając znacznie niższe wartości gęstości prądu pasywności dla próbek w tym elektrolicie, czego nie stwierdza sie dla kwasów o wyższym stężeniu np. 5 M, dla którego położenie krzywej sąsiaduje z krzywą dla kwasu 1M. Analizując zmiany potencjału dla eksperymentów prowadzonych w warunkach różniących się tylko stężeniem kwasu fosforowego można wnioskować, że jedyną przyczyną obserwowanego obniżenia potencjału w miarę wzrostu stężenia może być udział jonów fosforanowych w transporcie jonowym i wbudowanie ich do warstwy tlenkowej. Uwzględniając dominujące mechanizmy anodowego utleniania metali można przypuszczać, że odpowiedzialną za ponowny wzrost wartości potencjału w procesach anodowania Ti6Al4V w roztworach kwasu fosforowego o wyższych stężeniach może być zmiana mechanizmu pasywności z "wodnej", według reakcji (1), na mechanizm solny według reakcji (2). Wskazuja na to obserwacje autorki [28, 29] oraz krzywe zaprezentowane na RYS. 5c dla próbek poddanych przed anodowaniem polaryzacji katodowej o wartości potencjału - 800 mV. W wyniku tej obróbki nastąpiło usunięcie naturalnej warstwy tlenkowej, co ujawniło procesy zachodzące na odsłonietej powierzchni stopu w roztworach kwasu fosforowego.

Anodising ability of phosphoric acid, measured by log dE/dt was apparently the lowest for the concentration of 4M and the highest for 0.5 M H₃PO₄ on condition that the current density applied was not lower than 60 μ A/cm². The results of these observations, i.e. the voltage-time responses for the polarising current density 60 μ A/cm² in phosphoric acid of all concentrations are presented in FIG.4

Potentiodynamic polarisation curves for titanium (grade 1) in 1M H₃PO₄ and the Ti6Al4V ELI alloy samples (FIG.5) reveal that both materials are passivated within the whole range of phosphoric acid concentrations. The values of current densities grow slightly with the increase of acid concentration from 0.5M to 2M (FIG. 5a). In this respect they are consistent with the results of galvanostatic tests and with Singh's opinion [23] that weaker electrolytes correspond to higher passive currents. However, the curve for the samples polarised in 3 M H₃PO₄ (FIG. 5b) shows the reverse tendency. The passive current density for this particular concentration of phosphoric acid is much lower than for other solutions, even more concentrated. For instance, the potentiodynamic curve in FIG.4 for anodising of Ti6Al4VELI in H₃PO₄ 5 M is located close to the curve for 1M acid. On analysing the results of experiments carried out in the conditions that differ only in acid concentration, the only explanation for the observed decrease of potential with the concentration of acid increasing from 0.5M to 3M is the participation of phosphate ions in ionic transport in the oxide laver. Moreover, it is very likely that at further increase of acid concentration the dominant mechanism of the alloy oxidation changes from "water" passivation according to reaction (1) to "salt" passivation according to reaction (2). This statement can be supported by curves shown in FIG. 5c for alloy samples previously polarised at the potential of -800 mV. Removal of thin natural oxide layer reveals some processes that occur on bare alloy surface in contact with phosphoric acid solutions. However, complex shapes of the obtained potentiodynamic curves, with the number of peaks increasing with the concentration of the acid, make interpretation difficult, and require additional chemical and structural studies.

MATERIALOW

Zróżnicowany, począwszy od stężenia 3M, przebieg krzywych polaryzacyjnych i rosnąca w miarę wzrostu stężenia kwasu ilość reakcji wymagają szczegółowej identyfikacji w oparciu o dodatkowe badania materiałowe.



RYS. 5. Krzywe potencjodynamiczne Ti i Ti6Al4V w roztworach kwasu fosforowego.

FIG. 5. Potentiodynamic polarizations for Ti and Ti6Al4VELI in H,PO, solutions.

Wnioski

Galwanostatyczne i potencjodynamiczne badania anodowania stopu tytanu Ti6Al4VELI w roztworach kwasu fosforowego o stężeniu w zakresie 0,5-6M wykazały najniższą szybkość utleniania w roztworze o stężeniu 3 mol/dm³, w którym prawdopodobna jest zmiana mechanizmu pasywacji stopu. Obniżanie szybkości utleniania w zakresie stężeń 0,5-3M mogło wskazywać na udział jonów fosforanowych w transporcie jonowym w warstwie tlenkowej na powierzchni stopu.

Conclusions

Galvanostatic and potentiodynamic investigations of anodic behaviour of the Ti6Al4V ELI alloy in 0.5-6M phosphoric acid solutions revealed the lowest oxidation rate in the 3M solution, when the change of the anodising mechanism from water to salt passivation is very likely. The lower oxidation rate in the concentration range of phosphoric acid 0.5-3M may be the evidence of phosphate ions participation in transport processes and their incorporation into the oxide layer.

I MATERIALOW

Piśmiennictwo

[1]. Marciniak J.:Biomateriały w chirurgii kostnej, Wyd. Pol. Śl., 1992 Tytan i jego stopy, str.222.

[2]. Zarzycki D., Ciupik L., Krasicka-Cydzik E., Mstowski J.: XI Symp. Spond-ortop.i Traum., 1997

[3]. Luckey H., Kubli F.: Titanium Alloys in Surgical Implants, ASTM 796, 1981.

[4]. Yibas B.S i inni : Corosion Science, Vol. 37, No. 10. (1995), 1627-1636.

[5]. .Lai F.D. :Surface and Coating Technology, 58 (1993), 79-81.

[6]. Mitura E i inni: Diamond and Related Materials 5 (1996) 998-1001.

[7]. Chang i inni : Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 8 (1997), 193-200. [8]. Johansson C.B. i inni: J. of Materials Science: Materials

in Medicine 4, (1993), 132-142.

[9]. Wilson A i inni : Surface and Coating Technology, 63, (1994), 1-13.

[10]. Won Gyu Lee i inni : Thin Solid Films, 237 (1994), 105-111

[11]. Milosev I., B. Navinsek : Surface and Coating Technology, 63 (1994), 173-180.

[12]. David D.: J. Less-Common Mater. 69, (1981), 81

[13]. Delplancke J.L., Degrez M., Fontana A., Winand R.;

Surface Technology, 16, 2, (1982), 153-162 . [14].Awieranow E.E.: Sprawocznik po anodorowanie, Maszinostrojenie, Moskwa, s.83, 1988.

BADANIA WYTRZYMAŁOŚCIOWE I MIKROSKOPOWE **MINIPŁYTEK STOSOWANYCH** W LECZENIU ZŁAMAŃ **KOŚCI ŻUCHWY**

MILEWSKI G., DZIADUR W. POLITECHNIKA KRAKOWSKA

Streszczenie

Zastosowanie mikro lub minipłytek w leczeniu kości twarzo-czaszki uważa się obecnie za jedną z najskuteczniejszych metod chirurgii szczękowej. W pracy przedstawiono wyniki badań wytrzymałościowych i strukturalnych minipłytek z systemu Martina wykonanych ze stopu Cr-Ni-Mo stosowanych w osteosyntezie złamań trzonu żuchwy.

Badania wytrzymałościowe wykonano dla przypadku symulującego normalne obciążenie zgryzowe żuchwy. Badania strukturalne, stan powierzchni oraz warstwy pasywacyjnej minipłytek wykonano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

Badaniom poddano minipłytki dziewicze oraz usuniete po okresie 6 - 15 miesięcy w wyniku różnych komplikacji pooperacyjnych (obnażenie wszczepu,

[15]. Kocich J., G.Janak, J.Sevcikova, P.Guba: Koroze a Ochrana Materialu, 33, (1989), 3, s.43. [16]. Dowgird A., Kwiatkowski L., Radzikowski M. : Inżynieria Powierzchni, 1, (1996), 42. [17]. Lausma J. i inni: Applied Surface Science 45 (1990) 189-200. [18]. Patent USA No 5211 833, 1993. [19]. Hoar T.: Corrosion Science, 7, (1967), 341-355. [20]. Heusler K.E.: Corrosion Science, 29, (1989), 131. [21]. Singh V.B., Hosseini S.M.: Corrosion Science, Vol. 34, No 10, (1993), 1723-32. [22]. Mazhar A.A. i inni: Corrosion NACE, Vol. 44, No 10, 1988. [23]. Dyer C., Leach J., J.Electrochem. Soc., 125, (1978), 1032. [24]. Ohtsuka T., Masuda M., Sato N., J. Electrochem Soc., 132, (1985), 787. [25]. Shibata T., Zhu Yao-Can, Corrosion Science, Vol. 36, No 1 (1994), 153-163. [26]. Kim H.M. i inni: Journal of the Ceramic Society of Japan, Vol. 105, No 2, (1997),. 111-116. [27]. Johansen H.A., Adams G.B., P. Van Rysselberghe: J. Electrochem. Soc., Vol.104, (1957), 339. [28]. Krasicka-Cydzik E.: Mat. Symp. Sekcji Podstaw Techn. Maszyn KBM PAN, No 58, Pol. Ziel., 1998. [29]. Krasicka-Cydzik E .: the 10th International Scientific Conference, Żilina, Slovak Republic, 1998.

STRENGTH AND MICROSCOPIC **EXAMINATION OF MINIPLATES APPLIED** IN TREATMENT **OF MANDIBULAR** FRACTURES

MILEWSKI G., DZIADUR W. CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Abstract

.....

....

Application of micro or miniplates in treatment of craniofacial bones is considered at present as one of the most efficient methods of facial surgery. The paper presents the results of strength and structural investigations of miniplates from the Martin system made of Cr-Ni-Mo alloy applied in osteosynthesis of mandibular body fractures.

Strength examination was done for the case simulating a normal occlusal loading of mandible. Structure investigation, surface state and passivation layer were studied by means of scanning electron microscopy (SEM).

Virgin miniplates as well as ones removed after 6 -15 months due to various postoperative complications (implant baring, inflammation, osteolysis) were

References

stan zapalny, osteoliza).

Badania wytrzymałościowe nie wykazały obniżenia wytrzymałości minipłytek w wyniku stanów zapalnych twardych tkanek żuchwy. Zaobserwowano natomiast częściowe osłabienie warstwy pasywacyjnej implantów.

Słowa kluczowe: badania wytrzymałościowe, badania strukturalne, minipłytki, osteosynteza żuchwy

Wprowadzenie

Zastosowanie mikro lub minipłytek w leczeniu kości twarzo-czaszki uważa się obecnie za jedną z najskuteczniejszych metod chirurgii szczękowej [1, 3, 5]. Osteosynteza przy pomocy minipłytek zalecana jest we wszystkich przypadkach złamań kości żuchwy [4 . W pracy przedstawiono najczęściej występujący przypadek złamania trzonu żuchwy. Złamanie to jest najczęstszym przypadkiem poważnych urazów głowy występujących w wyniku wypadków komunikacyjnych, sportowych, w pracy lub pobić [2, 4, 6, 7, 8]. Obszary aplikacji minipłytek w typowych złamaniach podkłykciowych, trzonu żuchwy oraz bródki przedstawiono schematycznie na RYS. 1 [5].

Materiał kliniczny do badań otrzymano z Katedry i Kliniki Chirurgii Twarzowo-Szczękowej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W zastosowanym leczeniu chirurgicznym wykorzystano minipłytki z systemu Martina wykonane ze stopu Cr-Ni-Mo. W niektórych przypadkach zaobserwowano niepowodzenia pooperacyjne. Scharakteryzowano je jako obnażenie wszczepu, pojawienie się trwałych stanów zapalnych wokół wszczepu czy cechy osteolizy wokół śrub mocujących. W opisie przypadków podawano również wyraźne cechy korozji minipłytki oraz śrub.

Celem pracy było wykonanie badań wytrzymałościowych oraz strukturalnych reimplanto-

wanych minipłytek oraz stwierdzenie czy i ewentualnie w jakim stopniu występujące niepowodzenia pooperacyjne wpływają na obniżenie własności wytrzymałościowych zastosowanych minipłytek. Badania miały również wykazać na ile cechy stanów zapalnych oraz zmienne parametry elektrolityczne na powierzchni obnażonych wszczepów mogą mieć wpływ na strukturę powierzchni zastosowanych implantów.

żuchwy [5].

mandibular fractures [5].

Materiał i metodyka

Dostarczony materiał kliniczny obejmował 11 przypadków minipłytek reimplantowanych w okresie 6 do 15 miesięcy po operacji w wyniku różnych komplikacji pozabiegowych. Opis kliniczny badanych minipłytek zestawiono w TAB. 1. Wyniki badań odnoszono do tzw. próbek "dziewiczych" ujętych w tabeli jako nr 0. examined.

Strength examination did not indicate decrease strength of the miniplates due to the inflammatory states of hard tissues of mandible. However, partial loss of passivation layer of implants was observed.

Key words: strength examination, structural investigation, miniplates, mandibular osteosynthesis

Introduction

Application of micro or miniplates in treatment of craniofacial bones is considered at present as one of the most efficient methods of facial surgery [1, 3, 5]. Osteosynthesis by means of miniplates is recommended in all cases of mandibular fractures [4]. The paper presents the most often case of mandibular body fracture. This way of fracture becomes the most frequent case of serious head traumas due to traffic accidents, accidents at work and sport as well due to violence [2, 4, 6, 7, 8]. The areas of miniplates application for typical subcondylar, body and angle fractures of mandible are presented in FIG. 1 [5].

Clinical material for the tests was obtained from the Clinic

of Oral and Maxillofacial Surgery, Collegium Medicum, Jagiellonian University. Miniplates from the Martin system made of Cr-Ni-Mo alloy were applied in surgical treatment. In some cases postoperative complications were observed. They were characterized as: implant baring, persistent inflammation around implant, features of osteolysis around fixation screws. In clinical description visible features of miniplates and screws corrosion were described, too.

The aim of the paper was to carry out strength and structural examination of the reimplanted miniplates as well as to state if and how postoperative complications influence the decrease of strength of the applied miniplates. The tests were also

expected to show how the features of inflammatory states of mandibular hard tissues and variable electrolytic parameters on the surface of bared implants can influence their structure.

Material and methods

The delivered clinical material consisted of 11 cases of miniplates removed after 6 to 15 months after the operation because of various postoperative complications. Clinical description of the examined miniplates is presented in TABLE 1. The results of experiments were always discussed with reference to the results obtained for so called "virgin" samples, described in TABLE 1 as No. 0.



RYS. 1. Obszary aplikacji minipłytek w złamaniach

FIG. 1. Areas of application of miniplates in

Badania wytrzymałościowe wykonano na maszynie wytrzymałościowej firmy INSTRON TT 10 DM z wykorzystaniem systemu HOTTINGER DMClab do rejestracji i akwizycji danych. Badania wytrzymałościowe przeprowadzono dla przypadku symulującego zgryz prawidłowy. W przypadku takim minipłytka pracuje w złożonym stanie zginania ze skręcaniem. Dla celów badań wytrzymałościowych wykonano specjalny miniuchwyt mocujący, współpracujący ze szczękami maszyny wytrzymałościowej, którego konstrukcja i wymiary jarzm oddawały cechy anatomiczne pracy. żuchwy i minipłytki zespalającej w zgryzie prawidłowym. Strength tests were done by means of INSTRON TT 10 DM device with the use of HOTTINGER DMClab system to register and plot the experimental data. Strength examination were done for the case simulating normal occlusion. In such a case the miniplate works in a combined state of bending and torsion. For the purpose of the tests a special grip, fitting the original machine jaws, was constructed. Its construction and dimensions corresponded to the anatomic features of mandible and miniplate working at normal occlusion.

Nr próbki Number	Opis Description
0	Próbka "dziewicza"
	"Virgin sample"
1	Obnażenie wszczepu, czas pozostawania w organizmie – 6 miesięcy
	Bared implant, time in human body – 6 months
2	Bez obnażenia, czas – 15 miesięcy, w tym kilka miesięcy stany zapalne
	No baring, time – 15 months, few month inflammation
3	Bez obnażenia, czas – 12 miesięcy. Trwałe stany zapalne (korozja minipłytki + śrubki)
	No baring, time – 12 months. Persistent inflammatory states (miniplate and screw corrosion)
4	Bez obnażenia, czas – 12 miesięcy. Cechy osteolizy wokół śrub (RTG)
	No baring, time – 12 months. Features of osteolysis around screws (X-ray)
5	Bez obnażenia, czas – 12 mies. stan zapalny – 3 mies. Cechy osteolizy wokół śrub (RTG)
	No baring, time – 12 months. Inflammation – 3 months. Features of osteolysis (X-ray)
6	Bez obnażenia, czas – ok. 6 miesięcy. Cechy stanów zapalnych
	No baring, time – approx. 6 months. Features of inflammatory states
1	Bez obnażenia, czas – ok. 6 miesięcy. Cechy stanów zapalnych
	No baring, time – approx. 6 months. Features of inflammatory states
8	Obnazenie wszczepu – 2 miesiące. Czas – 12 miesięcy (korozja minipłytki)
	Baring implant – 2 months. Time – 12 months (miniplate corrosion)
9	Obnazenie wszczepu – 2 miesiące. Czas – 10 miesięcy
	Baring implant – 2 months. Time – 10 months
10	Bez obnazenia, czas – 6 miesięcy. Stan zapalny – ostatni miesiąc (lekka korozja minipłytki)
	No baring, time – 6 months. Inflammation – the last month (slight miniplate corrosion)
11	Na baring tima Casano miesięcy. Cecny stanu zapalnego wokół wszczepu
	No baring, time – 6 months. Features of osteolysis around screws

TABELA. 1. Opis kliniczny badanych minipłytek.

TABLE 1. Clinical description of the examined miniplates

RYS. 2. Schemat uchwytu do badań wytrzymałościowych minipłytek; 1 - próbka, 2, 3, 4 - jarzma, 5 - element przenoszący obciążenie, 6 - kołki centrujące.



FIG. 2. Scheme of grip for strength tests of miniplates; 1 - sample, 2, 3, 4 - yokes, 5 - element transferring the load, 6 - alignment pins.

Badania strukturalne minipłytek wykonano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej wykorzystując aparat firmy TESLA, model BS 300. Wykonano badania powierzchni oraz przełomów minipłytek. Zgłady metalograficzne wykonano metodą standardowej obróbki ściernej i polerowania. Przed obróbką wszystkie próbki zostały pokryte elektrolitycznie warstwą niklu w celu zapobieżenia niepożądanemu zaokrąglaniu powierzchni w czasie obróbki. Wybrane próbki były również dodatkowo wytrawiane 10% roztworem HNO₃ w celu obserwacji struktury austenitycznej materiału.

W obu przypadkach badań wytrzymałościowych oraz mikroskopowych wyniki badań odnoszono do wyników badań tzw. próbek dziewiczych. Structural investigations of miniplates were done by means of scanning electron microscopy (SEM) with the use of TESLA apparatus, model BS 300. Surface layer and fracture cross-sections of miniplates were examined. Metallographic cross-sections were prepared by means of standard grinding and polishing techniques. Prior to this the samples were electrolytically covered with a layer of nickel. Selected samples were aditionally etched with a 10% solution of HNO₃ in order to reveal the austenitic structure of the material.

The results of tests were discussed with reference to the so - called virgin samples.



FIG. 3. Strength characteristics of miniplates for osteosynthesis of mandible fractures.

35

MATERIALOV

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań wytrzymałościowych zestawiono zbiorczo na RYS. 3. Przyjęta metoda badań nie wykazała obniżenia własności wytrzymałościowych minipłytek w wyniku obnażenia wszczepu czy pojawienia się stanu zapalnego. Wyniki mieszczą się w zakresie błędów pomiarowych. Czas utrzymania implantu (maksymalnie do ok. 1.5 roku) jak również procesy towarzyszace obnażeniu wszczepu, tzn. osteoliza i zmiany parametrów elektrolitycznych powierzchni w wyniku kontaktu z płynami ustrojowymi i pozaustrojowymi nie powodują obniżenia własności wytrzymałościowych minipłytek. Należy jednak zaznaczyć, że liczba próbek do badań była stosunkowo nieliczna, co jest uwarunkowane ograniczoną dostępnością tego typu materiału klinicznego. Celem wervfikacji rezultatów badań wskazane byłoby przeprowadzenie większej liczby prób.

Wyniki badań mikroskopowych przedstawiają przykładowo fotografie na RYS. 4, 5, 6 i 7. Analiza wszystkich obrazów mikroskopowych pokazała, że wszystkie badane próbki, niezależnie od ich pochodzenia, nie sa zróżnicowane pod względem stanu powierzchni. Badania strukturalne nie wykazały żadnych zmian korozyjnych mogących powstać na granicach faz w wyniku kontaktu z płynami ustrojowymi i pozaustrojowymi. Utrzymana jest prawidłowa struktura austenityczna (RYS. 4), zarówno w próbkach dziewiczych jak i reimplantowanych. Na powierzchni widać wyraźne ślady mechanicznego dogniatania próbki, co jest założonym zabiegiem procesu technologicznego (RYS.5). Zaobserwowano natomiast częściowe osłabienie warstwy pasywacyjnej powierzchni reimplantowanych próbek. RYS. 6 i 7 przedstawiają wyraźne ślady wykruszania się węgli-

Results and discussion

The results of strength tests, shown in FIG. 3, did not indicate a decrease of miniplates strength due to the implant baring or inflammatory states of hard tissues of the mandible. The fluctuations are in the range of measuring error. Time of implant work (maximum up to approx. 1.5 year) as well as the processes accompanying implant baring, i.e. osteolysis and change of the electrolytic parameters on implant surface due to the contact with body and extracorporal fluids do not decrease the strength of miniplates. However, it is worth-mentioning that the number of examined samples was relatively small, because of the limited access to such clinical material. In order to verify the obtained results it is suggested to conduct the tests on a greater number of samples.

Examples of microscopic images are presented in FIGS. 4, 5, 6, 7. The analysis has shown that regardless of the sample type, miniplates do not differ in the surface layer state. Structural investigations do not indicate any corrosive changes which could appear at interfaces due to the contact with body and extracorporal fluids. Proper austenitic structure is preserved (FIG.4) both in the virgin and reimplanted miniplates. Die marks of plastic burnishing are visible on the surface of miniplates which is a feature of technological processing (FIG.5). On the other hand partial loss of the passivation layer of reimplanted samples was observed. FIGS. 6 and 7 show visible signs of carbide crumblig from the steel matrix. It could result from bared implants in a medium of body fluids and frequent change of electrolytic parameters on implant surface due to the contact with extracorporal fluids. However, carbide crumbling



- sample No 8.

I MATERIALOW
ków z osnowy stali. Wynika to zapewne z faktu przebywania obnażonych wszczepów w środowisku płynów ustrojowych jak i częstych zmian parametrów elektrolitycznych na powierzchni w wyniku kontaktu z płynami pozaustrojowymi. Nie można jednak również wykluczyć wykruszania się węglików z osnowy stali w wyniku zmęczeniowego "pittingu". Efektu tego nie zaobserwowano natomiast w próbkach dziewiczych.

Wnioski

1. Stany zapalne twardych tkanek żuchwy, kontakt z płynami ustrojowymi oraz pozaustrojowymi nie powodują obniżenia wytrzymałości minipłytek stosowanych do zespoleń złamań żuchwy.

2. Badania mikroskopowe nie wykazały widocznych zmian korozyjnych na granicach faz. Została utrzymana prawidłowa struktura austenityczna.

 Zaobserwowano częściowe osłabienie warstwy pasywacyjnej implantów w wyniku globalnego oddziaływania stanów zapalnych, płynów ustrojowych oraz częstych zmian parametrów elektrolitycznych na powierzchni obnażonych implantów.

Piśmiennictwo

[1]. Bartkowski S. i inni: Chirurgia szczękowa, Wydawnictwa Collegium Medicum UJ, Kraków, 1996.

[2]. Cieślik T., Lipiarz L., Jendroszczyk E., Habelak M., Szporek B.: Ocena wyników chirurgicznego leczenia złamań wyrostków kłykciowych żuchwy, Czasopismo Stomatologiczne, LI, 5 (1998), 349 - 353.

[3]. Flieger S.: Traumatologia szczęk i twarzy, PZWL, Warszawa, 1985.

BADANIA KOMPOZYTU WĘGLOWEGO W MIKROSKOPIE SKANINGOWYM PO WSZCZEPIENIU DO TKANKI KOSTNEJ ZWIERZĄT

Grzegorz Bajor*, Zbigniew Paszenda**, Janusz Bohosiewicz*, Jan Marciniak**

 * II Katedra i Klinika Chirurgii Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej w Bytomiu
 ** Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych Politechniki Ślaskiej w Gliwicach

Streszczenie

Podjęte badania kompozytu węglowego na wybranym do doświadczenia modelu zwierzęcym jakim był królik w okresie wzrostu kostnego miały wykazać przydatność tego materiału w chirurgii dziecięcej, szcze-

........

due to fatigue "pitting" could not be excluded either. This effect was not observed in virgin samples.

Conclusions

1. Features of inflammatory states in hard tissues of mandible, contact with body and extracorporal fluids do not decrease the strength of miniplates applied for osteosynthesis of mandible fractures.

2. Microscopic investigation did not reveal visible corrosive changes at interfaces. Proper austenitic structure was preserved.

3. Partial loss of the passivation layer of implants was observed due to the global influence of inflammatory states, body fluids and frequent change of electrolytic parameters on the surface of bared implants.

References

[4]. Krzymański G., Posmyk S., Domański W., Roszkiewicz W., Biernacka B.: Wskazania do chirurgicznego leczenia złamań żuchwy, Czasopismo stomatologiczne, XLIX, 11 (1996), 764 -770.

[5]. Mutaz B., Habal M., Ariyan S.: Facial fractures, B.C. Deker Inc., Toronto - Philadelphia, 1989.

[6]. Pogorzelska-Stronczak B., Cieślik T., Wróbel J.: Zastosowanie różnych elementów zespalających w chirurgicznym leczeniu złamań żuchwy, materiały II Krajowej Konferencji "Biomateriały w stomatologii", Ustroń, (1996), 121 - 126.

[7]. Pogorzelska-Stronczak B., Cieślik T., Wąsek A., Szporek B.: Ocena leczenia złamań kości twarzy płytkami zespalającymi odłamy na podstawie pięcioletniego materiału klinicznego, Czasopismo Stomatologiczne, XLIX, 4 (1996), 261 - 268

[8]. Tuovinen V., Norholt S. E., Sindet - Pedersen S., Jensen J.: A Retrospective Analysis of 279 Patients With Isolated Mandibular Fractures Treated with Titanum Miniplates, J Oral Maxillofac Surg., 52 (1994), 931 - 936.

SEM EXAMINATION OF CARBON COMPOSITE IMPLANTED INTO THE ANIMALS BONE TISSUE

GRZEGORZ BAJOR*, ZBIGNIEW PASZENDA**, JANUSZ BOHOSIEWICZ*, JAN MARCINIAK**

*DEPARTMENT OF PAEDIATRIC SURGERY IN BYTOM, SILESIAN MEDICAL ACADEMY IN KATOWICE **INSTITUTE OF ENGINEERING AND BIOMEDICAL MATERIALS, SILESIAN TECHNICAL UNIVERSITY IN GLIWICE

Abstract

Behaviour of carbon composite implanted in an animal model, being rabbit in the period of the osseous tissue growth, was examined in order to assess the usability of this material in paediatric surMATERIALOV

gólnie w traumatologii. Do doświadczenia użyto 16 królików, którym wszczepiano do światła kanału szpikowego grot węglowy. Materiał doświadczalny podzielono na trzy grupy w zależności od sposobu pokrycia podstawowego kompozytu węgiel-węgiel. W pracy przeprowadzono badania strefy rozdziału implant węglowy-tkanka kostna oraz powierzchni bocznej implantu węglowego. Obserwacje prowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym DSM - 940 firmy OPTON. Dla potrzeb badań przygotowano przekroje poprzeczne implantu węglowego łącznie z tkanką kostną. We wszystkich postaciach badanego kompozytu obserwowano postępującą od obwodu implantu biodegradację oraz powstawanie na tym miejscu nowej tkanki kostnej. W oparciu o przeprowadzone obserwacje uzyskano zachęcające wyniki doświadczalne stwarzające kliniczne możliwości zastosowania tych materiałów w traumatologii dziecięcej.

Słowa kluczowe: biomateriały, materiały węglowe, kompozyt węgiel-węgiel, badania doświadczalne, pirowęgiel, hydroksyapatyt.

Wprowadzenie

Opracowywanie nowych technik operacyjnych i ich wprowadzanie zwłaszcza do chirurgii dziecięcej obliguje do poszukiwania nowych materiałów [8, 9, 10]. Szczególnego znaczenia nabiera ten problem w zagadnieniach dotyczących traumatologii dziecięcej. Krótki okres jaki jest wymagany do uzyskania zrostu kostnego u dziecka niejednokrotnie nie znajduje uzasadnienia dla stosowania masywnych zespoleń z użyciem metalu [8, 15]. Ujemną stroną tych materiałów jest występowanie tzw. metalozy, czyli odczynu osteolitycznego wokół materiału zespalającego, jak również tzw. przesztywnienia kości [7, 8, 15]. Ponadto materiał tego typu nie powinien pozostawać w rosnącej kości zbyt długo. W krótkim okresie od zasadniczej operacji naprawczej dziecko jest poddawane drugiej operacji usunięcia tego materiału .

Rozwój badań doświadczalnych i klinicznych w ortopedii i traumatologii dorosłych nad możliwościami stosowania nowych biomateriałów stwarza perspektywy także dla chirurgii dziecięcej [8, 9, 10, 11, 12]. W ostatnich latach szczególną dynamikę rozwoju wykazują materiały węglowe. Dobra zgodność biologiczna implantów węglowych z tkanką kostną, tkankami miękkimi i podobieństwo własności mechanicznych, przede wszystkim z tkanką kostną, stwarza przesłankę do wykorzystania ich w wielu dziedzinach medycyny [1-6].

Kompozyty węgiel-węgiel (CFRC - carbon fibre reinforced carbon), czyli kompozyty o osnowie węglowej wzmacniane włóknami węglowymi, wyróżniają się w bogatej pod względem różnorodności struktur rodzinie węglowej szeregiem unikatowych właściwości fizycznych i chemicznych, umożliwiających niejednokrotnie pokonywanie barier materiałowych w wielu dziedzinach medycyny [7]. Główna przewaga tych materiałów w stosunku do konwencjonalnych wynika z możliwości kształtowania różnorodnej struktury począwszy od amorficznej a skończywszy na wysoce krystalicznej, a tym samym sterowania ich właściwościami w szerokich granicach w zależności od funkcji jakie elementy z tych materiałów muszą spełniać [13, 14].

Cel pracy

1. Ocena przydatności kompozytu węgiel-węgiel dla celów medycznych.

2. Określenie wpływu warstwy pirowęgla oraz hydroksyapatytu naniesionych na powierzchnię badanych implangery, especially in traumatology. Sixteen rabbits were used for the experiment in which carbon pin was inserted into the marrow cavity. The experimental material was divided into three groups, depending on the way the basic carbon-carbon composite was coated. Investigations of the carbon implant - bone tissue separation zone and of the lateral surface of the carbon implant were carried out within the project framework. Observations were carried out under the OPTON DSM-940 scanning electron microscope (SEM).

Cross-sections of the carbon implant along with the bone tissue were prepared for the examination. In all investigated cases, biodegradation progressing from the implant circumference was observed as well as development of a new bone tissue at the same place. The encouraging experimental results obtained in this work indicate that clinical use of these materials in the paediatric traumatology is possible.

Keywords: biomaterials, carbon-carbon composite, experimental studies, pyrocarbon, hydroxyapatite.

Introduction

Development of new operation techniques and their application, especially in the paediatric surgery requires searching for new materials [8, 9, 10]. This is especially important in paediatric traumatology. Short time span required for the development of the fractured bone union in the case of children, often does not justify employing massive uniting elements made of metal [8, 15]. The drawback of these materials is the occurrence of an osteolytic reaction around the uniting element, referred to as metalosis, as well as bone stiffening [7, 8, 15]. Moreover, metallic material should not remain too long in the growing bone. Shortly after the corrective operation the child must be subject to the second operation in order to remove the implant.

Development of experimental and clinical studies in orthopaedic surgery and traumatology of adults, related to the possibilities of employing new biomaterials, creates perspectives also for the paediatric surgery [8,9,10,11,12]. During the last years significant dynamics has been observed in the development of carbon materials. Good biological compatibility of carbon implants with the bone tissue and soft tissues, and above all similarity of their mechanical properties to those of bone tissue, provides the premises for using them in many fields of medicine [1-6].

The carbon-carbon composites (CFRC - carbon fibre reinforced carbon), i.e. carbon matrix composites reinforced with carbon fibres, distinguish themselves among the materials belonging to carbon family, by multiple unique physical and chemical properties. This enables overcoming the material barriers in many areas of medicine [7]. The main advantage of these materials, compared to the conventional ones, is the possibility of occurrence in various structures, from amorphous to highly crystalline. This permits to control their properties in a broad range, depending on the anticipated application [13, 14].

Goals of the project

1. Assessment of applicability of the carbon-carbon composite for medical purposes.

2. Determination of the effect of pyrocarbon and hydroxyapatite coatings deposited onto the surface of the investigated implants on the biological activity of their surfaces.

Materiał i metodyka

W pracy przeprowadzono badania kompozytów węglowych w postaci grotów o średnicy 4 mm i długości 40 mm wszczepianych do kanału szpikowego kości udowej królików. Do badań wykorzystano kompozyty typu węgiel-węgiel pokryte pirowęglem oraz warstwą hydroksyapatytu. Sposób otrzymywania kompozytów węglowych został opisany we wcześniejszej publikacji autorów [7, 8].

Do badań wykorzystano 16 królików rasy mieszanej w okresie wzrostu kostnego o wadze nie przekraczającej 2500 g, pochodzących z hodowli Centralnej Zwierzętarni Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. W zależności od rodzaju implantowanego materiału zwierzęta podzielone zostały na następujące grupy:

- I grupa obejmowała sześć królików, którym wszczepiono kompozyt węgiel-węgiel na okres 4, 14, 18, 20, 22 tygodni,

- II grupa obejmowała szesć królików, którym wszczepiano kompozyt węgiel-węgiel z naniesioną elektoforetycznie warstwą hydroksyapatytu (HAp) na okres 18, 20, 22 tygodni,

- III grupa obejmowała cztery króliki, którym wszczepiono kompozyt węgiel-węgiel z warstwą pirowęgla oraz hydroksyapatytu na okres 4 tygodni (1,87 mg HAp/cm), 14 tygodni (1,75 mg HAp/cm), 18 tygodni (2,03 mg HAp/cm) oraz 22 tygodni (1,87 mg HAp/cm).

Po założonym okresie implantacji badane próbki poddano obserwacjom w elektronowym mikroskopie skaningowym. W pracy skoncentrowano się głównie na ocenie strefy rozdziału implant węglowy-tkanka kostna oraz powierzchni bocznej implantów. Obserwacje prowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym DSM-940 firmy OPTON w zakresie powiększeń 10-3000 x. Dla potrzeb badań przygotowano przekroje poprzeczne implantów węglowych łącznie z tkanką kostną. Poszczególne próbki do badań cięto, płukano a następnie suszono strumieniem ciepłego powietrza.

Omówienie materiału

Przeprowadzone obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym na próbkach reprezentujących I grupę doświadczalną po 4 tygodniowym okresie implantacji wykazały rozpoczynający się proces pękania usystematyzowanych włókien postępujący od zewnętrznej powierzchni -RYS. 1. W próbkach pobranych po 14 tygodniowym okresie przebywania w organizmie królików widać wyraźnie zaznaczone, rozkawałkowane fragmenty włókien oklejone świeżą tkanką kostną ściśle ze sobą związane - RYS. 2. Wyraźnie daje się odróżnić rozpulchnienie samego włókna węglowego na jego końcach. Natomiast na próbkach po 18 tygodniowym okresie implantacji należy zwrócić uwagę na postępujący proces degradacji włókna manifestujący się spękaniem powierzchni styku implantu z tkanką kostną. Proces postępuje w głąb implantowanego wszczepu, co obserwuje się na przekroju poprzecznym. Same włókna węglowe są bardzo krótkie o wymieszanym układzie i oklejone obficie świeżą tkanką kostną - RYS. 3. Na próbkach po 22 tygodniowym okresie implantacji zaledwie udaje sie wydobyć zarysy przebiegających włókien. Są one wyraźnie rozmyte i ściśle pokryte tkanką kostną - RYS. 4.

Drugą grupę doświadczalną stanowiły króliki, którym wszczepiano do kości materiał z kompozytu węgiel-węgiel bez pirowęgla z nałożonym elektroforetycznie hydroksyapatytem. Po 18 tygodniowym okresie implantacji zaledwie udaje się wydobyć obrysy pojedynczych włókien węglowych masywnie oklejonych tkanką kostną - RYS.5.

Materials and methods

Carbon composites examined in this project had the arrowhead shape with a 4-mm diameter and 40 mm length, and were implanted into the marrow cavity of the femoral bone. Carbon-carbon composites were coated with pyrocarbon and hydroxyapatite. The method of carbon composite preparation was described elsewhere [7, 8].

Sixteen mixed breed rabbits in their bone growth period, with the weight not exceeding 2500 g, taken from the Central Animal Farm of the Silesian Medical Academy, were used in the investigations. The animals were divided into the following groups, depending on the type of implanted material:

- group I consisted of six rabbits, in which the carboncarbon composite was implanted for 4, 14, 18, 20, and 22 weeks,

- group II consisted of six rabbits, in which the carboncarbon composite with a hydroxyapatite (HAp) coating deposited electrophoretically was implanted for 18, 20, and 22 weeks,

- group III consisted of four rabbits, in which the carboncarbon composite with pyrocarbon and hydroxyapatite coatings was implanted for 4 weeks (1.87 mg HAp/cm), 14 weeks (1.75 mg HAP/cm), 18 weeks (2.03 mg HAp/cm), and 22 weeks (1.87 mg HAp/cm).

The investigated samples were examined under the scanning electron microscope (SEM) after the appropriate implantation periods. The project concentrated mainly on the assessment of the carbon implant - bone tissue separation zone and of the lateral surface of the carbon implants. Examinations were carried out using the OPTON DSM-940 scanning electron microscope, in the magnification range 10-3000. Cross-sections of the carbon implants along with the bone tissue were prepared for the examination. Samples were cut, rinsed and dried in warm air.

Description of the material

SEM examination of samples representing the experimental group I after the 4 week long implantation period revealed development of cracks propagating from the external surface of the systematically arranged fibres - FIG. 1. In samples remaining 14 weeks in the rabbit organism, there were distinctly visible fragmented fibres, wrapped in a new bone tissue and tightly bounded - FIG.2. Swelling of the carbon fibres at the ends was observed. After the 18 week implantation period the process of fibre degradation manifested itself in fracturing of the implant - bone tissue contact surface. This process progressed inward the implant, which was observed on the cross-section. The carbon fibres were very short, chaotically arranged, and abundantly enwrapped with a new bone tissue - FIG.3. After 22 weeks the fibre outlines were hardly visible. They were blurred and tightly overgrown with the bone tissue - FIG.4.

The experimental group II consisted of rabbits in which the carbon-carbon composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, without pyrocarbon, was implanted. After 18 weeks it was hard to discern the outlines of single carbon fibres enwrapped massively with the bone tissue - FIG.5. The bone tissue abundance around the carbon fibres was decidedly higher than in the previous group. After 20 weeks the samples showed strong adherence and growth of the carbon fibres into the sound bone tissue. The fibres themselves were overgrown with the new bone tissue - FIG.6.

Zdecydowanie jednak obfitość tkanki kostnej wokół włókien węglowych jest większa niż w grupie poprzedniej. Po 20 tygodniowym okresie przebywania w organizmie zwierząt doświadczalnych na próbkach widoczne jest solidne przyleganie i wrośnięcie włókien węglowych w zdrową tkankę kostną. Same zaś włókna są poprzerastane nową tkanką kostną - RYS. 6.



RYS. 1. Kompozyt węgiel-węgiel, 4 tydzień po implantacji, 1150x.

FIG. 1. C/C composite, 4 weeks after implantation, 1150x.



RYS. 3. Kompozyt węgiel-węgiel, 18 tydzień po implantacji, 600x.

FIG. 3. C/C composite, 18 weeks after implantation, 600x.



RYS. 5. Kompozyt węgiel-węgiel, HAp nałożony elektroforetycznie,18 tydzień po implantacji, 500/1000x.

FIG. 5. C/C composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 18 weeks after implantation, 500/1000x.



RYS. 2. Kompozyt węgiel-węgiel, 14 tydzień po implantacji, 500x.

FIG. 2. C/C composite, 14 weeks after implantation, 500x.



RYS. 4. Kompozyt węgiel-węgiel, 22 tydzień po implantacji, 2000x.

FIG. 4. C/C composite, 22 weeks after implantation, 2000x.



RYS. 6. Kompozyt węgiel-węgiel, HAp nałożony elektroforetycznie, 20 tygodni po implantacji, 1500x.

FIG. 6. C/C composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 20 weeks after implantation, 1500x.

BICMATERIALOW

Dwudziestodwutygodniowy okres implantacji obrazuje całkowitą przebudowę i przerośnięcie włókien węglowych tkanką kostną. Obraz ten sprawia wrażenie zdrowej tkanki kostnej mocno zespolonej z macierzą kości - RYS. 7.

W trzeciej grupie obserwowanych zwierząt implantowano kompozyt węgiel-wegiel pokryty pirowęglem z naniesionym elektroforetycznie hydroksyapatytem. Po 4 tygodniowym okresie implantacji obserwuje się fragmentację włókien węglowych oraz nieregularny ich układ. Pomiędzy włóknami i na ich powierzchni widać przylegającą tkankę kostną. Na zdjęciach obserwuje się intensywny wzrost świeżej tkanki kostnej wokół fragmentów włókien węglowych - RYS. 8. Po 14 tygodniowym okresie implantacji próbek obserwuje się na ich przekroju poprzecznym znaczną degradację i fragmentację postępującą od obwodu grota węglowego -RYS. 9. Materiał weglowy jest poprzerastany świeżą tkanką kostną, natomiast powierzchnia samego włókna jest rozpulchniona o zatartych obrysach. Preparaty po 18 tygodniach implantacji wykazują postępujący proces degradacii bardziej zaawansowany niż w poprzednich. Obraz próbek po 22-tygodniowej implantacji potwierdza procesy przerastania tkanką kostną włókien węglowych. Jedynie można się domyślać obrysów włókien weglowych w masie świeżej tkanki kostnej odbudowującej się na powierzchni fragmentów wegla - RYS. 10.



RYS. 7. Kompozyt węgiel-węgiel, HAp nałożony elektroforetycznie, 22 tydzień po implantacji, 1000x.

FIG. 7. C/C composite electrophoretically coated with hydroxyapatite, 22 weeks after implantation, 1000x.



RYS. 9. Kompozyt węgiel-węgiel pokryty pirowęglem z nałożonym elektroforetycznie HAp, 14 tydzień obserwacji, 20x.

FIG. 9. C/C composite with pyrocarbon and hydroxyapatite coatings, 14 weeks after implantation, 20x. The 22 week implantation period resulted in total reconstruction and overgrowing of the carbon fibres with the bone tissue. This picture gives the impression of a sound bone tissue tightly united with the bone matrix - FIG.7.

In group III of the investigated animals the carboncarbon composite coated with pyrocarbon and hydroxyapatite deposited electrophoretically was implanted. After 4 weeks fragmentation and irregular arrangement of the carbon fibres was observed. The enwrapping bone tissue was visible between the fibres and on their surfaces. Intensive growth of a new bone tissue around the carbon fibre fragments is visible in the microphotograph - FIG. 8. After 14 weeks significant degradation and fragmentation progressing from the carbon implant circumference were visible -FIG. 9. The carbon material was overgrown with a new bone tissue; however, the surface of the fibre itself was swelled, with a blurred outline. In the specimens after the 18 week implantation period the degradation process was more advanced than in the previous ones. Picture taken after 22 weeks confirmed the occurrence of processes of the carbon fibre overgrowing with the bone tissue. The outlines of carbon fibres could only be guessed in the mass of the new bone tissue being reconstructed on the surfaces of carbon fragments - FIG. 10.



RYS. 8. Kompozyt węgiel-węgiel pokryty pirowęlem z nałożonym elektroforetycznie HAp, 4 tydzień po implantacji, 500x.

FIG. 8. C/C composite with pyrocarbon and hydroxyapatite coatings, 4 weeks after implantation, 500x.



RYS. 10. Kompozyt węgiel-węgiel pokryty pirowęglem z nałożonym elektroforetycznie HAp, 22 tydzień po implantacji, 1000x.

FIG. 10. C/C composite with pyrocarbon and hydroxyapatite coatings, 22 weeks after implantation, 1000x. MATERIALOW

42

Dotychczas opracowane ŵłókniste materiały węglowe cechują się pozytywnymi właściwościami polegającymi na możliwości ich degradacji [2,4,6,7,8]. Ta zdolność bywa jednak kwestionowana przez niektórych autorów głównie z uwagi na nieznane losy zdegradowanych i uprzątanych z miejsca wszczepu drobin węglowych. Częściowo los cząsteczek węgla został wyjaśniony w oparciu o nasze spostrzeżenia poczynione w badaniach histopatologicznych [8].Zdolność degradacji włóknistego materiału węglowego oraz jego przezierność dla promieni rentgenowskich jest niezwykle korzystnym zjawiskiem w chirurgii dziecięcej [1,2,8].

Badania przeprowadzone w elektronowym mikroskopie skaningowym są świadectwem bardzo burzliwych procesów degradacji włókien węglowych. Tą metodą badano strefy rozdziału implant węglowy-tkanka kostna oraz powierzchni bocznej materiału.

Zdecydowanie najszybciej, spośród trzech omawianych materiałów, dochodzi do procesów fragmentacji włókna węglowego w samym kompozycie węglowym. Proces ten obserwuje się już w 4 tygodniu doświadczenia. Obrazuje się to odrywaniem dużych fragmentów pojedynczych włókien od niezmienionej powierzchni wszczepianego grotu weglowego. Takie procesy są słabiej nasilone w materiale węglowym pokrytym hydroksyapatytem oraz piroweglem i hydroksyapatytem. Natomiast w tych dwóch grupach już od 4 tygodnia eksperymentu obserwuje się bardzo intensywne procesy odbudowy świeżej tkanki kostnej intensywnie wrastającej pomiędzy długie odcinki włókien węglowych. Dodatkowym korzystnym ziawiskiem obserwowanym w kompozycie pokrytym hydroksyapatytem jest bardzo silne przyleganie świeżej tkanki kostnej do włókien weglowych, sprawiających wrażenie oblanych lukrem cukrowym. Z takim obrazem spotykamy się pomiędzy 14 a 18 tygodniem doświadczenia.

Wyraźnie widoczne zjawisko przerastania włókien węglowych świeżą tkanką kostną w kompozycie węgiel-węgiel obserwuje się dopiero od 18 tygodnia doświadczenia. W kompozycie pokrytym hydroksyapatytem po tym okresie nie obserwuje się zdecydowanego nasilenia procesów odnowy tkanki kostnej. Natomiast w kompozycie pokrywanym pirowęglem i hydroksyapatytem zaznacza się bardzo ścisłe przyleganie nowej tkanki kostnej do powierzchni drobin węglowych.

Po okresie 20 i 22 tygodniowym doświadczenia w kompozycie węgiel-węgiel zaledwie udaje się dopatrzyć obrysów włókien. Są one ściśle ze sobą zespolone tkanką kostną, a nierówna powierzchnia przypomina skorodowaną wierzchnią warstwę metalu. Obraz ten jest zdecydowanie inny w kompozytach pokrytych hydroksyapatytem, gdzie na przekroju poprzecznym widać głębokie pęknięcia i wrastanie tkanki kostnej w te szczeliny. Same zaś włókna mają rozmyte zarysy z obfitym nawarstwieniem świeżej tkanki kostnej powoli wypełniającej wolne przestrzenie pomiędzy włóknami.

Najkorzystniej zachowuje się kompozyt węglowy pokryty hydroksyapatytem i pirowęglem. Po 20 i 22 tygodniowym okresie doświadczenia obserwuje się bardzo obfite przyleganie i tworzenie świeżej tkanki kostnej. Same włókna mają rozmyte obrysy z obłoczkowatymi nawarstwieniami tkanki kostnej. Wystające pojedyncze końce włókien węglowych sprawiają wrażenie pustych w środku, a ich brzegi są zaokrąglone.

Badania przeprowadzone w elektronowym mikroskopie skaningowym potwierdzają łatwość zachodzenia procesów degradacji w obrębie czystego kompozytu węglowego. Natomiast odkładanie się świeżej tkanki kostnej na fragmentach rozdrobnionego węgla przebiega leniwie. Można by

.

Discussion

The fibrous materials developed to date have the advantageous properties consisting in their degradation capability [2,4,6,7,8]. This capability is sometimes questioned by some authors, mostly due to the unknown destiny of the carbon particles degraded and removed from the implant zone. The destiny of carbon particles has been explained in part, basing on observations made in the histopathological examination [8]. The degradation capability of fibrous carbon material and its transparency to X rays is very advantageous in the paediatric surgery [1,2,8].

SEM examinations indicate rapid degradation of carbon fibres. This method was used for the investigation of the carbon implant - bone tissue separation zones and of the lateral surface of the carbon implants.

The carbon fibre fragmentation processes are decidedly the fastest in the carbon composite itself. They are observed even in the 4th week of the experiment as detachment of big fragments of fibres from the unchanged surface of the carbon implant. These processes are less intensive in the hydroxyapatite-coated, as well as pyrocarbon and hydroxyapatite coated carbon material. However, in both groups, from the 4th week of the experiment already, very intensive reconstruction of a new bone tissue takes place, manifested by overgrowing of long segments of carbon fibres. The additional advantageous phenomenon observed in the hydroxyapatite-coated composite is very strong adhesion of the new bone tissue to carbon fibres, that gives the impression of sugar icing. This picture is encountered between 14 and 18 week of the experiment.

The clearly visible overgrowing of the carbon fibres with a new bone tissue in the carbon-carbon composite is observed from the 18th week of the experiment only. In the hydroxyapatite-coated composite the intensified bone tissue regeneration process is not evident after this period. However, in the pyrocarbon- and hydroxyapatite-coated composite, very tight adhesion of the new bone tissue to the surface of carbon particles is observed.

After the 20th and 22nd week of the experiment the outlines of fibres in the carbon-carbon composite are hardly discernible. They are tightly united with the bone tissue, and their uneven surface is similar to that of the corroded metal. The picture is completely different in the hydroxyapatite-coated composites, where deep cracks and bone tissue growing into the crevices are visible. The fibres themselves have blurred outlines with abundant overgrowths of the new bone tissue, slowly filling empty spaces between the fibres.

The hydroxyapatite- and pyrocarbon-coated carbon composite shows the best properties. After the 20th and 22nd week of the experiment, very good adhesion and abundant formation of the new bone tissue is observed. The fibres themselves have blurred outlines with a nebulous overlay of the bone tissue. Single protruding carbon fibre ends seem to be empty inside and their edges are rounded.

SEM examinations confirm easiness of the degradation processes within the pure carbon composite. However, deposition of the new bone tissue on the fragmented carbon particles progresses slowly. This might give the impression that there are difficulties in bone tissue nucleation on the smooth fibre surface. As soon as it occurs, calcification of the fibre surfaces proceeds very fast.

The sole presence of hydroxyapatite deposited onto the carbon fibre in the first period of the experiments does not influence significantly the bone-forming processes. However, in the final phase of the experiment overgrowing of the entire carbon fibre segments with the new bone tissue is clearly visible. This process resembles the inflow of the new bone tissue between the broken fragments of the imodnieść wrażenie, że tkanka kostna ma trudności z zaczepieniem się na gładkiej powierzchni włókna. W przypadku kiedy do tego dojdzie, to proces uwapniania powierzchni włókien przebiega bardzo intensywnie.

Sama obecność hydroksyapatytu naniesionego na włókna węglowe w pierwszym okresie prowadzonych doświadczeń nie wywiera istotnego wpływu na procesy tworzenia się kości. W końcowej fazie eksperymentu jednak wyraźnie widać zalewanie młodą tkanką kostną całych segmentów włókien węglowych. Proces ten sprawia wrażenie jakby młoda tkanka kostna napływała pomiędzy spękane fragmenty wszczepianego materiału.

Materiał węglowy pokryty pirowęglem z naniesioną warstwą hydroksyapatytu sprawia wrażenie w mikroskopie skaningowym najbardziej aktywnego. Obserwuje się tutaj od pierwszych tygodni eksperymentu intensywną degradację materiału. Równocześnie pomiędzy tymi fragmentami widać odkładającą się świeżą tkankę kostną. Na przekroju poprzecznym obserwuje się głębokie pęknięcia biegnące w głąb grotu węglowego. Podobnie jak w materiale węglowym pokrytym jedynie hydroksyapatytem, obserwuje się obfite kalafiorowate nawarstwienia młodej tkanki kostnej. Same natomiast włókna węglowe, a raczej ich zarysy sprawiają wrażenie pustych w środku o wyglądzie rurek. Końce tych włókien węglowych są zatarte, bądź wypełnione tkanką kostną.

Przeprowadzone obserwacje w elektronowym mikroskopie skaningowym wykazały, że z grupy badanych implantów najbardziej przydatnym z punktu widzenia traumatologii jest implant wykonany z kompozytu węgiel-węgiel pokryty warstwą pirowęgla w procesie pirolizy metanu oraz naniesioną elektroforetycznie warstwą hydroksyapatytu. Zastosowanie tego rodzaju materiału kompozytowego łączy w sobie zarówno cechy wytrzymałościowe materiału podłoża związane z wymaganiami biomechanicznymi rekonstruowanego narządu z określoną aktywnością biologiczną powierzchni implantu stymulującą proces tworzenia tkanki kostnej.

Wnioski

1. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na przydatność kompozytu węgiel-węgiel dla jego zastosowań medycznych, szczególnie w traumatologii dziecięcej.

2. Wytworzenie warstwy pirowęgla oraz hydroksyapatytu na powierzchni badanych implantów ma istotny wpływ na aktywność biologiczną ich powierzchni.

Piśmiennictwo

[1] Górecki A., Kuś W., Błażewicz S., Chłopek J., Powrożnik A.: Możliwości zastosowania materiałów węglowych w chirurgii narządu ruchu. Chir. Narz. Ruchu, 55, 2, (1990), 131-138.

[2] Cieślik T.: Płytki i śruby z kompozytu węgiel-węgiel do zespoleń odłamów żuchwy: badania doświadczalne i kliniczne. Rozprawa habilitacyjna, SAM, Katowice 1993.

[3] Minns R.J.: Biological Resurfacing Using Synthetic Materials: A Review of Surgical Philosophy and Clinical Experience Using Carbon Fibre. Proceedings of the NATO Advanced Study Institute on Materials Science and Implant Orthopaedic Surgery II, Chania, Crete, Greece, (1994), 223-228.

[4] Baczuk K., Bielecki K.: Zastosowania polskich materiałów węglowych w medycynie. Post. Nauk. Med., 8, 1, (1995), 45-47.
[5] Pogorzelska-Stronczak B., Cieślik T.: Zastosowania włóknistych materiałów węglowych w medycynie. Czas. Stomat., 49, 5, (1996), 340-344.

[6] Cieślik T., Pogorzelska-Stronczak B.: Kliniczna ocena płytek i śrub z materiału złożonego węgiel-węgiel stosowanych do zespolenia złamanej żuchwy. Czas. Stom., 49, 8, (1996), 559-563. planted material.

The pyrocarbon-coated carbon material, with the deposited hydroxyapatite layer seems to be the most active. Intensive material degradation is observed during the first weeks of the experiment. Simultaneously, deposition of the new bone tissue between the fibre fragments takes place. Deep cracks propagating into the carbon implant are observed on the cross-section. Similarly as in the case of carbon material coated with the hydroxyapatite only, abundant cauliflower-like overgrowths of the new bone tissue are observed. However, the carbon fibres or rather their outlines look like tubes empty inside. Ends of these carbon fibres are blurred or filled with the bone tissue.

SEM examinations have revealed that among the investigated implants, the most suitable one - from the viewpoint of application in traumatology - is the carbon-carbon composite coated with pyrocarbon in the methane pyrolysis process and with hydroxyapatite in the electrophoretic deposition. This type of composite material combines both suitable mechanical properties of the matrix material, connected with the biomechanical requirements of the reconstructed organ, and excellent biological activity of the implant surface, stimulating the formation of bone tissue.

Conclusions

1. Results of the investigations carried out in this work indicate usefulness of the carbon-carbon composite in medical applications, especially in the paediatric traumatology.

2. Deposition of the pyrocarbon and hydroxyapatite coating on the surface of the investigated implants has a significant effect on the biological activity of their surfaces.

References

[7] Chłopek J.: Kompozyty węgiel-węgiel. Otrzymywanie i zastosowanie w medycynie. Polski Biuletyn Ceramiczny, Ceramika, 52, Kraków 1997.

[8] Bajor G., Błażewicz M., Bohosiewicz J., Chłopek J., Stoch A.: Badania po-wierzchni kompozytów węglowych pokrytych hydroksyapatytem po implantacji. Inżynieria Biomateriałów, 3, (1998), 21-27.

[9] Grażyński J., Jankowski A., Krzyżański Z.: Aktualne poglądy na fizjologię gojenia złamań kości.Probl.Chir.Dziec.22, (1995), 153.

[10] Grochowski J., Szklarczyk S., Mieżyński W., Stankiewicz D., Obruśnik A., Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Wyniki operacyjnego leczenia ubytków kości ramiennych owiec zmodyfikowanymi wszczepami HAP. Ceramika, 46, 8, (1994), 53-58.

[11] Rand J.,A.,Kai Nan An,Chao Y.,S.:A comparison of the effect of open intramedullary nailling and compression-plate fixation on fracture -site blood flow and fracture union.J.Bone Joint Surg.63-A, (1981), 427.

[12] Sarmiento A., Schaffer J., Beckerman L.: Fracture healing in rat femoral as affected by functional weight-bearing.J.Bone Joint Surgery. 59-A, (1977), 369.

[13] Shirota T.: Healing around hydroxylapatite coated istalled with rewasculized bone graft. Proc.of Congr. of JAOP, Hamburg 1992.

[14] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiweicz Z.: Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny. Ceramika. 46, 8, (1994), 155-158.

[15] Weber B.G., Brunner Ch., Freuler F.: Treatment of fractures in Children dnd adolescents.Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1980.

PROTEZA KOŃCZYNY ••••••• MIEDNICZNEJ U PSA - OPIS PRZYPADKU

JACEK STERNA

Katedra Chirurgii Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wstęp

Częstym zabiegiem po poważnych, niegojących się uszkodzeniach obwodowej części kończyny u psów jest amputacja. Aby zapobiegać uszkodzeniom kikuta w czasie kontaktu z podłożem polecana jest w podręcznikach chirurgii małych zwierząt amputacja wysoka. Ten zabieg jest ogólnie rzecz biorąc dobrze przyjmowany przez właścicieli [1] i oczywiście przez psy. Możliwość niskiej amputacji i użycia protezy u koni [2] i dobra akceptacja protezy przez kozę [3] zachęciły autora do niskiej amputacji i zaprojektowania protezy u psa.

Opis przypadku

Suka rasy owczarek kaukaski w wieku 1 roku zastała dostarczona do kliniki z ciężką raną lewej stopy i stawu stępowego. Z powodu martwicy śródstopia i palców oraz septycznego zapalenia stawu stępowego była konieczna amputacja. Właściciel nie zgodził się na wysoka amputację.

W znieczuleniu ogólnym przeprowadzono amputację w dalszej 1/3 piszczeli i strzałki. Trzpień z kompozytu węglowoepoxydowego został wprowadzony siła reki i dobity młotkiem do jamy szpikowej kości piszczelowej. Dodatkowo ustalono go dwoma drutami Kirschnera przewiercając trzpień wraz z kością oraz klinuiac stożkowym gwoździem z kompozytu węglowo-epoxydowego wprowadzonym pomiędzy trzpień i istotę korową kości piszczelowej. Skórę zamknieto szwami wezełkowymi. Do końca trzpienia doklejono żywicą akrylową Zhermacryl-S (Zhermapol ® Ltd.) duraluminiowa rurkę wygiętą na kształt zgięcia stawu stępowego w pozycji stojącej. Na dalszy koniec rurki założono kulke z tej samej żywicy i gumowy bucik. Na okres tygodnia zastosowano opatrunek sztywny z Delta-cast® (Johnson and Johnson)



RYS. 1. Usunięta proteza z popękanym trzpieniem. Zauważ prawidłowo zużyty gumowy bucik.

FIG. 1. Removed prosthesis with cracked stem. Note well wornup rubber shoe.

PROSTHESIS OF THE PELVIC LIMB IN THE DOG - CASE REPORT

JACEK STERNA

DEPARTMENT OF SURGERY WARSAW AGRICULTURAL UNIVERSITY

Introduction

Common procedure after a serious, non-healing damage of the limb in dogs is amputation. To prevent the injury of stump in contact with the ground, high amputation is recommended by handbooks of small animal surgery. This procedure is generally accepted by the owners (1) and of course by the dogs. The possibility of amputation on lower level and the reported use of prosthesis in horses (2) and acceptance of the prosthesis in the goat (3) encouraged the author to perform amputation on the lower level and to design a prosthesis in a dog.

Case report

A 1-year-old female Caucasus sheep dog with a heavy wound of the left foot and tarsal joint was presented in our clinic. Because of the necrosis of the metatarsus and digits and septic inflammation of tarsus, amputation was necessary. The owner did not accept high amputation.

In general inhalation anaesthesia an amputation at 1/3



RYS. 2. Druga proteza po usunięciu.

FIG. 2. The second artificial limb after removing.

of the tibia and fibula was performed. A stem made of carbon-epoxyd composite was introduced by force of hand and hammered into the medullar cavity of the tibia. Additional fixation was provided by interlocking (two Kirschner wires) and introducing of a conical pin (carbon-epoxyd composite) between the stem and the tibial cortex. The skin was closed by interrupted stitches. A tube made of aluminium-magnesium alloy bent according to the shape of the tarsal joint in standing position was attached to the stem with the acrylic resin Zhermacryl-S (Zhermapol ® Ltd.). The other end of the tube was furnished with a ball made of the same resin and a rubber shoe was put on it. Soft dressing and Delta-cast ® (Johnson and Johnson) as well as Linco-spectin ® (Upjohn) was applied for a week. The dog started walking using the prosthesis on the next day after the operation. The artficial limb

BIOMATERIALOW

na miękkim podkładzie i zalecono iniekcje Linco-spectin® (Upjohn). Pies zaczął chodzić używając protezy następnego dnia po operacji. Proteza była używana przez miesiąc, zanim doszło do destabilizacji. Protezę usunięto (RYS.1), a rana wygoiła się bez komplikacji.

Sześć tygodni później nowy trzpień został wprowadzony do jamy szpikowej kości piszczelowej. Operacja była podobna do opisanej powyżej. Trzpień pozostawał w kończynie 6 tygodni. Pies używał tej krótkiej protezy (RYS.2). Po tym czasie trzpień nadal był stabilny. Obwodowa częśc protezy dołączono w taki sposób jak przy poprzedniej operacji. Ta druga proteza była używana przez następny miesiąc i również uległa destabilizacji. Proteza zastała usunięta i rana wygojona.

Dyskusja

Do rozwiązania pozostają problemy mechaniczne i biomateriałowe. Pierwszy trzpień przebity drutami Kirschnera popękał w miejscu przewiercenia. Krótszy i grubszy następny trzpień nie popękał w tym miejscu lecz też uległ destabilizacji bez widocznego uszkodzenia. Trzpień powinien zostać zaprojektowany inaczej lub wykonany z innego biomateriału, zanim zakotwiczone w kości przebijające skórę protezy staną się użyteczne w chirurgii psów.

Piśmiennictwo

[1]. Caberry C.A., Harvey H.J.: Owner Satisfaction With Limb Amputation in Dogs and Cats. J Am. Anim. Hosp.Assoc.23; (1987), 227.

[2]. Crawley G.R., Grant B.D., Krpan M.K., Major M.D.: Longterm Follow-up Partial Limb Amputation in 13 Horses. Vet. Surg. 18, (1) (1989), 52-55

BADANIE WPŁYWU MATRIAŁÓW HEMOSTATYCZNYCH NA PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZĘ

Maria Szymonowicz*, Jakub Kratochwil**, Roman Rutowski*, Jolanta Staniszewska-Kuś*, Danuta Paluch*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Katedry Chirurgii Urazowej Akademii Medycznej we Wrocławiu **Okręgowy Szpital Kolejowy we Wrocławiu

Streszczenie

W pracy przedstawiono ocenę wpływu wchłanialnych materiałów hemostatycznych na układ krzepnięcia i fibrynolizę. W osoczu cytrynianowym ubogopłytkowym oznaczono wybrane parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. Badania wykonano przed i po czawas used for one month until destabilisation of the stem occurred. The prosthesis was removed (FIG.1) and the wound healed without complications. Six weeks later a new stem was introduced into the tibial medullar cavity. The operation was similar as that described above. The stem was left in the limb for six weeks. The dog used this short artificial limb (FIG.2). After this time the stem was still stable. The distant part of the artificial limb was fixed as in the first operation. The second artificial limb was used for another month but it destabilised again. The prosthesis was removed and the wound healed.

Discussion

There are mechanical and biomaterial questions to be resolved. The first stem interlocked by Kirschner wires cracked at the point of interlocking. The next, shorter and thicker stem did not crack but it destabilised without any visible damage. Another design or material of the stem must be developed before the bone-anchored skin-penetrating limb prosthesis will be useful in canine surgery.

References

[3]. Sterna J. Protezowanie kończyn tylnych u kozy domowej z użyciem biomateriałów węglowych. Opis przypadku. Biom. w med. i wet. Kraków 1997.

ÉVALUATION OF THE INFLUENCE OF TOPICAL HAEMOSTATICS MATERIALS ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS PARAMETERS

Maria Szymonowicz*, Jakub Kratochwil**, Roman Rutowski*, Jolanta Staniszewska-Kuś*, Danuta Paluch*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Institute of Experimental Surgery and Biomaterials Research, The Chair and Clinic of Traumatology and Hand Surgery, Medical Academy, Wrocław. **District Railway Hospital in Wrocław

Abstract

In this paper the influence of absorbable topical haemostatic materials on coagulation and fibrynolysis was evaluated. The parameters of coagulation and fibrinolysis were determined after a certain time of incubation in human citrated plasma. It has been stated

sowym kontakcie z materiałami hemostatycznymi. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że materiał Spongostan nie wpływa na aktywność białek układu krzepnięcia i fibrynolizy, natomiast materiał Surgicel powoduje ich inaktywację, a materiał Tacho-Comb tworzy skrzep fibrynowy bez udziału osoczowych składników krzepnięcia.

Słowa kluczowe: materiały hemostatyczne, badania in vitro osocza, parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy

Wprowadzenie

46

Powodzenie każdego chirurgicznego zabiegu jest cześciowo zależne od prawidłowego układu hemostazy. Jednak nawet sprawnie działający układ hemostazy może być niewystarczający dla zatrzymania utraty krwi bez mechanicznego zamknięcia uszkodzonych i krwawiących naczyń. Ucisk i podwiązywanie krwawiących naczyń jest zwykle czasowym opanowywaniem utraty krwi. Elektrokoagulacja i stosowanie laserów CO2 dają korzyści i są wygodne w użyciu, powodują jednak termiczne uszkodzenie tkanek z następczą reakcją na ciało obce, która może prowadzić do opóźnienia gojenia się rany. Z tego powodu wprowadzono do użytku medycznego szereg środków do nieurazowego tamowania krwawienia, działających miejscowo hemostatyczne. Mają on tę zaletę, że ulegają wchłanianiu, które polega na ich powolnej degradacji i resorpcji poszczególny fragmentów stosowanego materiału. W badaniach nad przydatnością materiałów hemostatycznych w zaopatrywaniu uszkodzonych i krwawiących ran z narządów miąższowych stwierdzono, że resorpcji najszybciej ulega Surgicel-14 dni następnie TachoComb-28 dni, najdłużej Spongostan-60 dni[1]. Zatrzymywanie krwawienia przez materiały hemostatyczne polega na mechanicznym ucisku powierzchni rany i na wytworzeniu rusztowania, na którym może dojść do tworzenia się i obkurczenia skrzepu. Materiał Spongostan z powodu swojej porowatej struktury posiada dużą zdolność wchłaniania krwi, co powoduje aktywację krwinek płytkowych i uczynnienie układu krzepnięcia, następstwem czego jest powstanie skrzepu fibrynowego i zatrzymanie krwawienia.

Podobny mechanizm tamowania krwawienia zachodzi przy użyciu Surgicelu. Po nasyceniu krwią pęcznieje, stając się galaretowatą masą, która ułatwia tworzenie się skrzepu [2,3]. W przypadku kontaktu z raną materiału Tacho-Comb następuje rozpuszczenie substancji pokrywających preparat. Ze składników materiału zostaje utworzony skrzep skierowany do światła rany, który jest wolniej rozkładany. Zaletą materiału jest hemostaza i klejenie tkanek [4]. Należy jednak podkreślić, że preparaty te są skuteczne jedynie wtedy, gdy nie ma odchyleń od stanu prawidłowego w układzie krzepnięcia. Podany proces przekształcania materiału, a z tym związane tworzenie skrzepu i tamowania krwawienia, odnosi się do kontaktu z krwią.

W Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów AM we Wrocławiu podjęto badania wpływu materiałów hemostatycznych na płyn ustrojowy jakim jest osocze krwi.

Celem pracy jest ocena zmian ilościowych parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza po czasowym kontakcie z wchłanialnymi materiałami hemostatycznymi w badaniach in vitro.

Materiał i metodyka

Do badań użyto: piankę żelatynową Spongostan Special oraz dzianą tkaninę z regenerowanej celulozy Surgicel- firmy Johnson & Johnson Medical Poland Sp. z o.o. jak that Spongostan has no influence on the activity of proteins of coagulation and fibrinolysis, Surgicel deactivates them and TachoComb creates fibrin clot without plasma coagulation proteins.

Key words: topical haemostats, plasma in vitro tests, parameters of coagulation and fibrinolysis

Introduction

Success of every surgical procedure partially depends on patients coagulation system. Even efficient haemostasis may be not sufficient to stop bleeding without mechanical closing of the cut and bleeding vessels. There are many methods of controlling blood loss during the operation. We can mention packing, haemostatic sutures, electrocoagulation, and lasers. In the cases of profuse parenchymal bleeding the best results are achieved with absorbable topical haemostatic materials. Their advantage is that the second procedure to remove them from the operation field is unnecessary. According to the in vivo tests the shortest resorption time - 14 days - is observed with Surgicel, then - 28 days - with Tachocomb, and the longest - 60 days with Spongostan [1].

Bleeding is stopped by haemostatic materials, by mechanical pressure on the surface and by producing scaffolding for the formation of clot. Spongostan with its porous structure shows high blood absorption with activation of platelets and clotting system resulting in the formation of fibrin clot and haemostasis. After soaking with blood Surgicel becomes a gelatinous mass which facilitates clotting and homeostasis [2,3]. The effect of TachoComb is quite different. In contact with blood, thrombin and fibrinogen contained in the superficial part of the material are released. Fibrinogen in presence of thrombin produces a fibrin cloth, which is protected by aprotynin [4].

The investigations carried out at the Experimental Surgery and Biomaterial Research Department have been undertaken to evaluate the influence of topical haemostats on human plasma.

The aim of this study was to determine quantitatively the changes of coagulation and fibrinolysis parameters in plasma after the contact with topical haemostats.

Material and methods

Tested materials were the following: gelatine sponge -Spongostan Special, woven cloth consisting of the oxidised regenerated cellulose - Surgicel, both produced by Johnson and Johnson Medical Poland and fibrin-glue-coated collagen fleece TachoComb produced by Hafslund Nycomed Ag, Austria.

The tests were conducted on human citrated plasma 0 Rh +, centrifuged in 1500g for 10 minutes. In sterile test tube 1.4 cc of plasma was contacted with 0.0098 g of the evaluated material and gently mixed. The contact time at room temperature was 5, 15, 30 and 60 minutes. Coagulation and fibrinolysis parameters were checked before and after the contact with the tested materials.

- Several parameters were determined:
- APTT with Silimat (bioMerieux),
- prothrombin time (PT) and INR with Isimat (bioMerieux),
- thrombin time (TT) with Hemolab Trombicalci (bioMerieux),
- recalcination time (CT) [5]
- fibrinogen concentration (Fb) with Hemolab Firinomat (bioMerieux)
- coagulation inhibitors, screening test with correct plasma [5,6],
- soluble complexes of fibrin monomers (SCFM), paracoagulation Godal test [5],

i siateczkę z włókniny kolagenowej pokrytej klejem fibrynowym TachoComb - firmy Hafslund Nycodem Ag Austria.

Doświadczenie wykonano na osoczu cytrynianowym otrzymanym z krwi ludzkiej grupy O Rh+ pobranej od dawców w proporcji 1:10 (1cz.objętości 0.11 mol/l cytrynianu trisodowego i 9 cz.objętości krwi) i wirowanej 1500g x 10 minut. Do jałowych probówek plastykowych z korkiem zawierających po 0.0098g ocenianego, materiału odmierzono po 1.4 cm spulowanego , dokładnie wymieszanego ubogopłytkowego osocza cytrynianowego. Próby delikatnie mieszano ruchem wahadłowym. Czas kontaktu materiału z osoczem w temperaturze pokojowej wynosił 5, 15, 30, 60 minut. Osocze przed i po kontakcie z materiałami pobrano do badania układu krzepnięcia i fibrynolizy.

Oznaczono następujące parametry:

- czas kaolinowo-kefalinowy (APTT) zestawem Silimat firmy bioMerieux,
- czas protrombinowy (PT) i współczynnik protrombinowy (INR) zestawem Isimat firmy bioMerieux,
- czas trombinowy (TT) zestawem Hemolab Trombicalci firmy bioMerieux,
- czas rekalcynacji(CT) [5],
- stężenie fibrynogenu(Fb) zestawem Hemolab Fibrynomat firmy bioMerieux,
- inhibitory krzepnięcia, próba skryningowa z dodaniem osocza prawidłowego [5,6],
- obecność rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny(SCFM),test parakoagulacji Godala [5],
- fibrynolizę skrzepu frakcji euglobulin osocza (ELT)[6],
- obecność produktu degradacji fibryny, Dimeru-D (DD) testem lateksowym FDP-Slidex direct firmy bioMerieux.

Pomiary czasu krzepnięcia wykonano na koagulometrze Fibrintimer firmy Bering. Wyniki badań poddano analizie statystycznej z użyciem programu Statystica 5.0, przyjmując poziom istotności p < 0.05.

Wyniki badań

Średnie wartości parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza przed (grupa kontrolna) i po kontakcie z materiałem Spongostan, Surgicel oraz TachoComb podano w TABELI 1.

Wartość APTT, PT i INR oraz TT i CT otrzymana dla osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu ze Spongostanem nie różniła się istotnie od średniej tych parametrów w grupie kontrolnej. Stężenia fibrynogenu w czasie obserwacji, było w zakresie wartości porównywalnych z grupą kontrolną. Skrzep frakcji euglobulin miał postać jednolitego, żelowego skrzepu, dla którego wartość ELT i WAF była na poziomie grupy kontrolnej. W procesie nieenzymatycznego krzepnięcia, ujemna próba Godala, stwierdzono zmętnienie osocza porównywalne z grupą kontrolną. Ujemna próba aglutacyjna, określona testem immunolateksowym, wskazuje na obecność w osoczu Dimeru-D na poziomie grupy kontrolnej.

Wartość APTT, TT i CT dla osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu z materiałem Surgicel była znacznie wydłużona, przekraczająca dla każdego parametru czas 200 s. Otrzymano 5.5-6.5 krotne przedłużenie APTT, 12.5-15.5 krotne przedłużenie TT oraz 1.5-2.5 krotne przedłużenie CT w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej. Wartość APTT i TT skorygowanego osocza po 5,15,30 i 60 minutach kontaktu z materiałem była wydłużona i istotnie różna w porównaniu do wartości w grupie kontrolnej. Wartość PT(INR) po 5 minutach była istotnie wydłużona w porównaniu do grupy kontrolnej. Najwyższe wartości PT (INR), istotnie różne w stosunku do średniej w grupie kontrolnej, stwierdzono po 30 i 60 minutach. Wartość fibrynogenu po 5 minutach było porównywalne z wartością w grupie kontrolnej. Istotne zmniejszenie Fb stwierdzono po 15,

- fibrinolysis of euglobulin clot (ELT) and firinolytic activity indicator [6],
- fibrin degradation products, Dimer-D(DD) with the use of latex FDP test - Slidex direct (bioMerieux)

Clotting time was measured with Fibrintimer coagulometer (Bering). All data were analysed with Statystica 5.0 software, at p < 0.05.

Results

Mean values of plasma parameters before and after the contact with Spongostan, Surgicel and TachoComb are presented in TABLE 1.

Values of APTT, PT, INR, TT and CT after 5, 15, 30 and 60 min contact of plasma with Spongostan didn't differ from those of the control group. Fibrynogen concentration, negative Godal test, DD, ELT and WAF were similar to those of the control group.

APTT, TT and CT after 5, 15, 30 and 60 minutes of contact with Surgicel were significantly longer, each parameter exceeding 200 s. APTT was 5.5 - 6.5 times longer, TT was 12.5 - 15.5 times longer and CT was 1.5 - 2.5 times longer than the corresponding values of the control group. APTT and TT of the correct plasma after 5, 15, 30 and 60 minutes were longer and significantly different from the control group. PT and INR after 5 minutes were also significantly different from the control plasma. The value of PT (INR) after 30 and 60 minutes was the highest and significantly different from the mean of the control group. Fibrinogen concentration after 5 minutes was comparable to the control group but after 15, 30 and 60 minutes it was significantly lower. Observation of the clot didn't show its lysis during 480 minutes. The Godal test was negative and there was no agglutination during the latex test.

APTT and PT (INR) after the contact of TachoComb with plasma were comparable with the control group. TT after 5, 15, 30 and 60 minutes were significantly higher and CT significantly lower than the control group. Fibrinogen concentration after 30 minutes was similar to the control group but after 60 minutes it was significantly lower. Observation of ELT during 480 minutes revealed no lysis of the clot. The Godal test was positive; there was agglutination of the plasma after the contact with monoclonal antibodies.

Discussion

....

The experiments were conducted to evaluate quantitative changes of parameters of clotting and fibrinolytic systems after the contact with absorbable haemostatic materials. This estimation was made to determine and compare the activation of plasma coagulation and fibrinolytic components.

Activation of the intrinsic coagulation was estimated by APTT and CT and of the extrinsic coagulation by PT. Conversion of the fibrinogen to fibrin was tested by TT. Presence of the inhibitor in plasma was determined by the correction test and SCFM by Godal ethanol test. Activity of the fibrinolytic system was tested by lysis of euglobulin clot. Dimer-D was estimated by immunolatex test. The obtained data allowed for evaluating the influence of the tested materials on coagulation and fibrinolysis.

Spongostan because of its porous structure has great ability to absorb plasma (FIGS.1-3). Temporary contact of Spongostan with plasma doesn't change its pH and has no influence on parameters of coagulation and fibrinolysis. Gelatine sponge in direct contact with the low-platelet plasma doesn't activate proteins of clotting and fibrinolysis systems.

Materiał Material	Czas Time	АРТТ	APTT kor	P	Т	TT	TT kor	СТ	Fb	EL	Т	Próba Godala Godal's test	Test lateksowy Latex test	
	min.		s	S	INR	S		S	g/l	min.	WAF			
	0	34,73 ± 0,72		$10,85 \pm 0,27$	$1,03 \pm 0,07$	16,13 ± 0,46		113,46 ± 7,44	2,93 ±0,15	158,33 ±9,31	1,82 ± 0,16	ujemna negative	ujemny negative	
Spongostan	5	34,45 ± 0,54		10,85 ± 0,21	$0,98 \pm 0,03$	16,22 ± 0,17		110,72 ± 8,31	3,07 ± 0,08	159,16 ± 9,17	$1,90 \pm 0,10$	ujemna negative	ujemny negative	
n=6	15	35,30 ± 0,49		$11,06 \pm 0,30$	$1,01 \pm 0,03$	16,26 ± 0,12		114,63 ± 5,12	2,93 ± 0,12	158,33 ±9,31	1,86 ± 0,13	ujemna negative	ujemny negative	
	30	34,98 ± 0,41		$11,02 \pm 0,17$	$1,01 \pm 0,02$	15,85 ± 0,21		115,23 ± 3,86	2,94 ± 0,09	160,0 ± 7,07	1,83 ± 0,11	ujemna negative	ujemny negative	
	60	35,05 ± 0,34		$10,98 \pm 0,29$	$1,00 \pm 0,03$	16,06 ± 0,28		114,70 ± 4,53	2,86 ± 0,10	116,60 ± 10,65	1,77 ± 0,19	ujemna negative	ujemny negative	
	0	36,56 ± 0,96	36,27 ± 1,25	12,73 ± 0,21	1,15 ± 0,02	16,25 ± 0,27	16,33 ± 0,31	109,05 ± 6,11	2,72 ± 0,07	161,66 ± 10,32	$0,91 \pm 0,10$	ujemna negative	ujemny negative	
Surgicel	5	>200	53,73** ±7,81	18,16*** ± 0,77	1,40*** ± 0,05	>200	22,70*** ± 0,47	>200	2,65 ± 10,0	skrzep clot	> 0,55 ± 0,02	ujemna negative	ujemny negative	
n=6	15	>200	54,77** ± 8,01	18,58*** ± 0,61	1,44*** ± 0,04	>200	25,93*** ± 1,01	>200	2,61* ± 0,08	skrzep clot	> 0,54 ± 0,02	ujemna negative	ujemny negative	
	30	>200	57,50** ± 8,31	20,48*** ± 1,10	1,56*** ± 0,08	>200	27,27*** ± 0,88	>200	2,54* ±0,15	skrzep clot	> 0,53 ± 0,03	ujemna negative	ujemny negative	
	60	>200	58,53** ± 8,41	20,93*** ± 1,04	1,61*** ± 0,08	>200	28,50*** ± 0,69 >200		2,52** ±0,11	skrzep clot	> 0,52 $\pm 0,02$	ujemna negative	ujemny negative	
	0	35,48 ± 0,62		$10,80 \pm 0,02$	0,99 ± 0,01	16,06 ± 0,31		107,28 ±8,59	2,76 ±0,11	147,5 ± 6,12	1,87 ± 0,05	ujemna negative	ujemny negative	
TachoComb	5	35,52 ± 0,55		10,56 ± 0,21	$0,98 \pm 0,02$	18,95*** ± 0,85		97,0* ± 1,46	2,74 ± 0,14	skrzep clot	> 0,57 $\pm 0,02$	dodatnia positive	dodatni positive	
n=6	15	35,80 ± 0,62		10,53 0,22	0,97 ± 0,03	19,56*** ± 0,50		92,62* ± 4,39	2,72 ± 0,09	skrzep clot	> 0,55 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive	
	30	35,43 ± 0,60		10,60 ± 0,17	0,98 ± 0,01	19,98*** ± 0,56		86,82*** ± 5,0	2,66 ± 0,07	skrzep clot	$> 0,55 \pm 0,02$	dodatnia positive	dodatni positive	
	60	35,61 ± 0,61		10,65 ± 0,23	0,99 ± 0,03	20,25*** ± 0,68		85,38*** ± 3,69	2,63 ± 0,08	skrzep clot	>0,55 ± 0,02	dodatnia positive	dodatni positive	

TABELA 1. Wartości parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy osocza kontrolnego (czas 0) i po kontakcie z materiałami hemostatycznymi.

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 – różnice statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej.

TABLE 1. Values of coagulation and fibrynolysis parameters for the plasma control group (time 0) and for the group after contact with hemostatic materials.

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 – differences of statistic importance in relation to the control group.



RYS. 1. Spongostan.

FIG. 1. Spongostan.

RYS. 2. Spongostan - po umieszczeniu w osoczu.

FIG. 2. Spongostan after contact with plasma.

RYS. 3. Spongostan - po 5 min. FIG. 3. Spongostan - after 5 min.

30 jak i 60 minutach. Obserwacje czasu lizy skrzepu wykonane do 480 minut wykazały, że nie ulega on w tym czasie upłynnieniu. Brak aglutynacji osocza stwierdzono w próbie lateksowej oraz brak żelowania w próbie Godala. Wartość APTT i PT(INR) dla osocza po kontakcie z materiałem TachoComb we wszystkich czasach obserwacji nie różniła się istotnie od średniej w grupie kontrolnej. Surgicel is made of the oxidised cellulose. After a short contact with plasma it degrades. During first 3 minutes it gradually changes to colloid at the surface of the plasma. During the enzymatic decomposition besides the colloidal form zol - which transforms into gel, observed are single fibres of cellulose. This means that not all of the substance after the contact with plasma undergoes changes.

MATERIALOW

Wartość TT po 5 jak i 15, 30 oraz 60 minutach była istotnie wydłużona w porównaniu do grupy kontrolnej. Istotne skrócenie CT wystąpiło we wszystkich czasach obserwacji. Wartość fibrynogenu do 30 minut obserwacji było na poziomie wartości w grupie kontrolnej. Po 60 minutach zaobserwowano zmniejszenie stężenia Fb, istotne w odniesieniu do grupy kontrolnej. Obserwacje ELT wykonane do 480 minut wykazały, że skrzep euglobulin nie ulega lizie. W procesie nieenzymatycznego krzepnięcia stwierdzono żelowowanie osocza, próba Godala dodatnia. Zaobserwowana aglutynację osocza w porównaniu do osocza kontrolnego, pod wpływem monoklonarnych przeciwciał.

Omówienie

Wykonane badania miały na celu prześledzenie ilościowych zmian parametrów układu krzepniecia i fibrynolizy osocza po kontakcie z materiałami hemostatycznymi. Ocena tych zmian posłużyła do określenia i porównania stopnia aktywacji układu krzepnięcia i fibrynolizy przez badane materiały. Aktywację układu krzepnięcia w układzie wewnątrzpochodnym oceniono testem APTT i CT a w układzie zewnątrzpochodnym oceniono testem PT. Konwersję fibrynogenu w fibrynę określono testem TT. Obecność w osoczu inhibitora oceniono testem korekcyjnym, a występowanie rozpuszczalnych kompleksów SCFM oceniono testem parakoagulacyjnym (próba etanolowa Godala). Ocene aktywności układu fibrynolitycznego wykonano poprzez badanie samoistnej lizy skrzepu frakcji euglobulin. Oznaczono również Dimer-D testem immunolateksowym. Uzyskane wyniki pozwoliły ocenić wpływ materiałów hemostatycznych na układ krzepnięcia i fibrynolizę.

Materiał Spongostan z powodu swojej porowatej porowatej struktury posiada dużą zdolność wchłaniania osocza(RYS.1,2,3). Czasowy kontakt Spongostanu z osoczem nie zmienia jego wartości pH oraz nie wpływa na oznaczone parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. Wartości pomiarowe czasów krzepnięcia osocza (APTT,PT,TT) po kontakcie ze Spongostanem są porównywalne z wartościami czasów osocza kontrolnego. Świadczy to o nieupośledzonym procesie krzepnięcia w układzie wewnątrz- i zewnątrzpochodnym.

Surgicel jest preparatem występującym w postaci jałowych płatów tkaniny. Jako materiał jest kopolimerem glukozy otrzymanym przez utlenianie glukozy. Po umieszczeniu w osoczu szybko go chłonie i ulega degradacji. Stopniowo przekształca się z postaci stałej w postać koloidową, umiejscawiając się przy powierzchni osocza. Proces trwa do 3 minut. Przemiany te są wynikiem obecności w osoczu enzymów, które powodują rozpad i enzymatyczną depolimeryzację materiału. W czasie enzymatycznej modyfikacji materiału w osoczu, oprócz jego koloidowej postaci - zolu, która przechodzi po zastygnięciu w postać sztywną - żel, stwierdzono pojedyncze włókna celulozy. Świadczy to o tym, że nie cała ilość materiału weszła w reakcję z osoczem dając nową postać (RYS. 4,5,6,7,8). Obecność materiału w osoczu i jego rozpad , przyczynił się do zmniejszenia wartości pH osocza z 7,4-7,8 do pH 6,0-6,5. Zmniejszenie wartości pH było prawdopodobnie jednym z czynników przyspieszających proces żelowania materiału. Oceniając układ krzepnięcia osocza ubogopłytkowego po czasowym jego kontakcie materiałem Surgicel, stwierdzono wyraźne wydłużenie APTT, TT jak również PT.

Obserwowano zmniejszenie stężenia fibrynogenu. Utworzony skrzep euglobulin osocza nie uległ lizie w przewidzianym czasie badania. W osoczu nie stwierdzono zwiększonej ilości rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (test Godala, ujemny)oraz produktu degradacji fibryny, Dimeru-D (ujemny test lateksowy). Zaobserwowane wydłużenie czasów może sugerować o tym, że w wyniku konThe presence of Surgicel in plasma and its decomposition decrease the pH value from 7.4 - 7.8 to 6.0 - 6.5 which is probably the reason for the accelerated transformation of zol to gel (FIGS. 4 - 8). The observed change of the coagulation parameters may suggest that the contact of Surgicel



ponents caused by hindered transformation of their inactive form to the active form or by the presence of inhibitors. After the correction test it can be stated that the observed effects are connected with the presence of an inhibitor in the plasma [5,7,8,9]. Activity of the plasma coagulation components is related to the pH value. The low pH value could cause deactivation of proteins and decrease their biological activity [10].

The clot of euglobulin was different from that of the control plasma. It contained packed mass inside. The clot was not

taktu materiału z osoczem nastąpił ilościowy niedobór czynników krzepnięcia, jak również o tym, że aktywacja nieczynnego czynnika do formy czynnej została zahamowana lub, gdy na aktywny czynnik zadziałał inhibitor. W celu wyjaśnienia przyczyny wydłużenia czasów: APTT, TT, CT wykonano test korekcyjny, polegający na oznaczeniu APTT i TT w mieszaninie osocza 1:1 badanego i prawidłowego. W przypadku, gdyby w mieszaninie osocza nastąpiła normalizacja czasu krzepnięcia do wartości obserwowanej w kontrolnym osoczu, można wtedy stwierdzić, że przedłużenie czasu jest wywołane niedoborem czynników krzepnięcia. Otrzymany w osoczu skorygowanym wydłużony APTT świadczy o obecności w badanym osoczu inhibitora krzepnięcia [5,7,8,9].

Na aktywność białek układu krzepnięcia oprócz składu materiału również miała wpływ zmniejszona wartość pH osocza . Zmniejszenie wartości pH osocza mogło przyczynić się do inaktywacji białek, obniżenie ich własności biologicznych. Stwierdzone zmniejszenie stężenia fibrynogenu nie ma znaczenia diagnostycznego, ponieważ mieści się w zakresie wartości prawidłowych dla osocza kontrolnego wynoszących od 2-5 g/l [10].

Żelowy skrzep euglobulin różnił się od skrzepu uzyskanego z osocza kontrolnego. W centralnej jego części widoczna była zbita masa. Skrzep ten nie uległ fibrynolizie w zakresie wartości od 150 minut do 360 minut ,wartości objętych normą [6]. Związane jest to z reakcjami zachodzącymi podczas procesu wytrącania frakcji euglobulin z osocza. Pod wpływem jonów Ca centrum skrzepu zostało utworzone z wykrzepionych włókien celulozy, które pozostały w osoczu po degradacji i przekształceniu materiału. Włókna te najprawdopodobniej inaktywują plazminę, enzym fibrynolizy obecną w osadzie euglobulin, nie doprowadzając do jego fibrynolizy.

TachoComb jest preparatem hemostatycznym występującym w postaci jałowej siateczki składającej z włókniny kolagenowej pokrytej klejem fibrynowym ze składnikami przyśpieszajacymi koagulację. W czasie kontaktu materiału TachoComb z osoczem, obserwowano zmianę jego postaci. Warstwa kolagenowa pęczniała, a z warstwy kleju fibrynowego w wyniku rozpuszczenia i reakcji enzymatycznej został utworzony żelowy skrzep. Proces trwał do 5 minut (RYS.9,10,11). fibrinolysed after 150 - 360 minutes [6]. This is connected with reactions taking place during the precipitation of euglobulin from plasma. Under the influence of Ca²⁺ ions the clot centre was formed by cellulose fibres that remain in plasma after the degradation of Surgicel. These fibres probably deactivate plasmin and stop fibrinolysis. TachoComb is a sterile collagen fleece covered with a fibrin glue with some components accelerating coagulation of blood. In contact with blood TachoComb changed its form.

RYS. 7. Surgicel – widoczna postać koloidowa przy powierzchni osocza po 5 min.

FIG. 7. Surgicel – colloidal form visible on the border of the plasma surface after 5 min.

RYS. 8. Surgicel – postac żelowa po 5 min.

FIG. 8. Surgicel – gel form after 5 min.





RYS. 9. TachoComb.

FIG. 9. TachoComb.

MATERIALOW

RYS. 10. TachoComb – po umieszczeniu w osoczu.

FIG. 10. TachoComb – after contact with plasma .



RYS.11. TachoComb – usunięty z osocza razem ze skrzepem fibrynowym.

FIG. 11. TachoComb – removed from the plasma with the fibrinous clot after 5 min.

Oceniając układ krzepnięcia, stwierdzono prawidłowy APTT i PT, świadczy to o nie zmienionej aktywności składników osocza w zewnątrz- i wewnątrzpochodnym układzie krzepnięcia. Zmiany w wartościach czasu wapniowego- skrócony CT nie mają znaczenia diagnostycznego i mogą sugerować o nieznacznej aktywacji składników w układzie zewnątrzpochodnym, bez ich zużycia. Dodatni test Godala, świadczy o zwiększonej ilości w osoczu rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny (SCFM). Wykazany dodatni test lateksowy wskazuje na obecność w osoczu produktu degradacji fibryny stabilizowanej, Dimeru-D w stężeniu przekraczającym próg czułości próby(500 µg/ml) [11].Zmniejszenie stężenia fibrynogenu w osoczu przy dłuższym kontakcie z opatrunkiem może być wynikiem działania na niego trombiny pochodzącej z materiału jak również tworzeniem kompleksów z monomerami fibryny. Zmniejszenie stężenia nie ma znaczenia diagnostycznego, ponieważ mieści się w zakresie wartości objętych normą [10]. Zaobserwowane wydłużenie TT przy prawidłowym stężeniu fibrynogenu, może być związane z unieczynnieniem trombiny przez obecne w osoczu kompleksy rozpuszczalne monomerów fibryny głównie FDP. Produkty rozpadu fibrynogenu - FDP powstały pod wpływem działania enzymu plazminy na fibrynogen, ale nie osoczowy, lecz pochodzący z warstwy kleju fibrynowego materiału [11].

W czasie kontaktu z osoczem delikatna struktura, a szczególnie warstwa kleju fibrynowego ulegała naruszeniu, degradacji i sedymentacji do płynu. W ten sposób fibrynogen z materiału stał się produktem dla enzymu fibrynolizy, plazminy.

Wytrącony żelowy skrzep frakcji euglobulin osocza różnił się od skrzepu powstałego z osocza kontrolnego. W centralnej części skrzepu była zbita masa. Skrzep ten nie ulegał upłynnieniu. W czasie procesu wytrącania skrzepu frakcji euglobulin, monomery fibryny obecne w osoczu z udziałem jonów Ca²⁺ i czynnika XIII, tworzą skrzep fibrynowy, stanowiąc jego centrum. Stabilizowana fibryna została otoczona warstwą euglobulinową, w której stwierdzono pierzastą postać spolimeryzowanej fibryny tworzącą jakby rusztowanie, które prawdopodobnie zabezpiecza przed upłynnieniem całego skrzepu. W warstwie euglobulinowej oprócz osoczowych składników w tym i plazminy przypuszczalnie występuje aprotynina, pochodząca ze składu materiału.

Aprotynina opóżnia dezintegrację przez plazminę skrzepu euglobulin, oraz utworzonego skrzepu fibrynowego przy powierzchni materiału.

Reasumując, można stwierdzić, że materiał Spongostan nie wpływa na ilościowe zmiany parametrów układu krzepniecia i fibrynolizy. Zmiana stanu skupienia materiału Surgicel wpływa na układ krzepniecia osocza. Proces jest złożony. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że w osoczu w wyniku kontaktu z materiałem Surgicel, dochodzi do zatrzymania procesu krzepnięcia. Związane to jest przypuszczalnie z procesem zahamowania aktywacji czynników krzepnięcia lub działaniem na aktywny czynnik inhibitora. Takie mechanizmy sa uruchamiane przez heparyne i tak może działać materiał Surgicel w kont akcie z osoczem. W czasie kontaktu osocza z materiałem TachoComb, warstwa kolagenowa materiału pęczniała a w warstwie kleju fibrynowego, w wyniku działania na nią enzymów proteolitycznych osocza, nastąpił rozpad peptydów fibrynowych a pod wpływem trombiny przekształcenie fibrynogenu w monomery fibryny. Monomery fibryny w obecności składników przyspieszających krzepnięcie utworzyły pod warstwa kolagenowa skrzep fibrynowy. Uzyskane wyniki potwierdzaja, że skrzep powstał ze składników materiału. Stwierdzony w osoczu zwiększony poziom rozpuszczalnych kompleksów monomerów fibryny świadczy o tym, że w wyniku działania trombiny na fibrynogen w materiale nie cała ilość monomerów fibryny spolimeryzowała w skrzep, część z nich weszła

The layer of collagen swelled and that of fibrin glue dissolved and produced a fibrin clot. The overall process took 5 minutes (Figs. 9-11).

The correct APTT and PT indicate normal activity of the intrinsic and extrinsic clotting system. Changes of CT have no diagnostic importance and may suggest slight activation of the extrinsic coagulation system without consumption of plasma components. Positive Godal test shows an increased amount of SCFM. Positive latex test proves that the concentration of Dimer-D, the degradation product of stabilised FDP is higher than 500 μ g/ml [11].

Decreased level of fibrinogen in plasma after a longer contact with TachoComb may result from the activity of thrombin from the dressing and from the formation of complexes with fibrin monomers. The observed lowering of fibrinogen concentration is not significant because it falls in the acceptable normal range [10]. Elongation of TT with normal fibrinogen concentration may be connected with deactivation of thrombin by complexes of fibrin monomers dissolved in plasma, mainly FDP. FDP are produced in a reaction between plasmin and fibrinogen - not coming from plasma but from the layer of fibrin glue of TachoComb [11]. In contact with plasma the delicate structure of Tachocomb and especially its fibrin glue layer, changes, dissolves and comes to plasma. In this way fibrinogen from haemostat becomes a product for the fibrinolytic enzyme - plasmin.

The clot of euglobulins differs from that of the control plasma. It contained condensed mass in its central part and was not soluble. During the process of clotting, fibrin monomers from plasma together with Ca²⁺ ions and factor XIII formed fibrin clot. Stabilised fibrin was covered with a layer of euglobulin in which there was a feather-like form of polymerised fibrin constituting sort of scaffolding that probably prevented complete dissolution of the clot. In the layer of euglobulin, beside plasma components, there was probably aprotynin from the material. Aprotynin delayed disintegration of the euglobulin clot and the fibrin clot at the surface of TachoComb.

To resume data from the in vitro tests it can be stated that Spongostan in contact with low-platelet plasma does not influence the parameters of coagulation and fibrinolysis. When Surgicel is in contact with plasma the clotting components of plasma are not consumed but the clotting process is stopped, probably due to hindered activation of plasma components or inhibitor effect on active components. Similar mechanisms are activated by heparin. TachoComb in contact with plasma produces fibrin clot that comes from the layer of fibrin glue. Plasma components do not take part in this process. Activation of clotting is stronger than fibrinolysis because of aprotynin that deactivates plasmin - the fibrinolytic enzyme.

Conclusions

1. Spongostan in contact with the low-platelet plasma does not change the activity of proteins of clotting and fibrinolysis.

2. Surgicel in contact with the low-platelet plasma undergoes immediate changes and deactivates plasma components that affect the parameters of coagulation and haemostasis. It acts as a clotting inhibitor.

3. TachoComb in contact with the low-platelet plasma produces a clot on its surface without the participation of plasma components. The clot is stabilised by aprotynin that inhibits plasmin. **SI-MATERIALOW**

w skład kompleksów w osoczu. Procesowi tworzenia się skrzepu fibrynowego, czyli aktywacji krzepnięcia, przeciwdziała proces upłynniania skrzepu, czyli aktywacja fibrynolizy. Aktywacja układu krzepnięcia jest silniejsza w wyniku obecności aprotyniny, inaktywatora plazminy, która zwiększa stabilność fibrynolizy.

Wnioski

52

1. Spongostan w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym nie wpływa na zmianę aktywności białek układu krzepnięcia i układu fibrynolitycznego.

2. Surgicel w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym ulega natychmiastowej degradacji i inaktywuje składniki osocza, co wywołuje ilościowe zmiany parametrów układu krzepnięcia i fibrynolizy. Działając jako inhibitor wykazuje w ten sposób właściwości antykoagulacyjne.

3. TachoComb w kontakcie z osoczem ubogopłytkowym tworzy przy swojej powierzchni skrzep, bez udziału osoczowych składników. Skład materiału spowodował zwiększenie poziomu kompleksów SCFM i Dimeru-D, a obecność aprotyniny przeciwdziała szybkiemu upłynnianiu skrzepu.

BADANIA BIOLOGICZNE WŁÓKIEN Z DIBUTYRYLOCHITYNY

Danuta Paluch^{*}, Lidia Szosland^{**}, Jerzy Kołodziej^{*}, Jolanta Staniszewska-Kuś^{*}, Maria Szymonowicz^{*}, Leszek Solski^{*}, Bogusława Żywicka^{*}

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateria-Łów Katedry Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki Akademii Medycznej we Wrocławiu **Katedra Chemii Fizycznej Polimerów Politechniki Łódzkiej w Łodzi

Streszczenie

BICMATERIAŁOW

Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania dibutyrylochityny przy użyciu kwasu nadchlorowego jako katalizatora reakcji estryfikacji chityny posiada szereg zalet: jest prosta, szybka i daje powtarzalne wyniki. Metoda ta powoduje znaczną degradację chityny, jednak nadal można otrzymać produkty reakcji o dostatecznie wysokiej masie cząsteczkowej o własnościach błono- i włóknotwórczych. Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiacje, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach w ewentualnym stosowaniu do celów biomedycznych.

....

Piśmiennictwo

References

[1] Staniszewska-Kuś J., Rutowski R., Kratochwil J., Paluch D., Szymonowicz M. Solski L. Żywicka B.Badania porównawcze materiałów do sródoperacyjnej hemostazy, Inżynieria Biomateriałów 1, 3, (1998),17-20.

[2] Wagner W.R. i wsp.: Comparative in vitro analysis hemostatic agents, J.Surg.Res.66(1996) 100-108.

[3] Coln D., Horton J., Ogieden M.E. and Buja L.M. Evaluation of hemostatic agents in experimental splenic lacerations. Am. J.Surg. 145, (1983), 256-261.

[4] Agus G. B., Bono. A. V., Olivero S., Peilowich A. Et. Al.: Hemostatic efficacy and safety of Tachocomb in surgery. Ready to use and rapid hemostatic agent.Int. Surg. 81, 3, (1996), 316-319.

[5] Bomski H.: Podstawowe laboratoryjne badania hematologiczne. WL PZWL Warszawa 15-16, (1995), 226-309.

[6] Pawelski S.: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii.PZWL Warszawa 1990, 193-258.

[7] Rodak B. Diagnostik Hematology. Chapman and Hall, Philadelpia 1995.

[8] Kasper C.K., Ewing N. P.: Acquired inhibitors of plasma coagulation factors. J. Med. Tech. 3, (1986), 431-436.

[9] Casu B.: Strukture and biological activity of heparin, Adv.Carb.Chem. Biochem.43, (1985), 51-134.

[10] Sawicka B.: Fibrynogen- wartość diagnostyczna wyników oznaczeń,Diagn.Lab., 34, 4, (1998), 587-595.

[11] Jastrzębska M.: Znaczenie D-Dmerów w diagnostyce zaburzeń hemostazy.BioMerieux, sp.z.o.o.1998, 3-18.

A BIOLOGICAL INVESTIGATION OF DIBUTYRYLCHITIN FIBRES

Danuta Paluch*, Lidia Szosland**, Jerzy Kołodziej*, Jolanta Staniszewska-Kuś*, Maria Szymonowicz*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Institute of Experimental Surgery and Biomaterials Research, The Chair and Clinic of Traumatology and Hand Surgery, Medical Academy, Wrocław. ** Department of Physical Chemistry of Polymers, Technical University of Łódź,

Abstract

...

....

The procedure of preparation of dibutyrylchitin using perchloric acid as a cheap and easily available catalyst of chitin esterification, evaluated at the Division of Physical Chemistry of Polymers, has a number of advantages: it is simple, quick and reproducible. This method promotes significant degradation of chitin. However, it is possible to synthesise a polymer with a molecular mass high enough to from strong films, fibres or microspheres. Butyrylation of chitin gives a high yield of easily soluble products with a degree of substitution ca 2. Excellent properties of dibutyrylchitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine. The main target of our investigation was to evaluate the biocompatibility of

Celem pracy była ocena biozgodności włókien z dibutyrylochityny.Badania obejmowały:

1. Badania biologiczne wyciągów wodnych:

- Badania działania cytotoksycznego;
- Badania działania hemolitycznego;
- Badanie śródskórnego działania drażniącego.

2. Badania implantacyjne:

- Badania odczynu tkanek po implantacji do jamy otrzewnowej myszy;

- Ocenę zmian w poziomie cytokin IL 1ß i IL 6

w płynie z jamy otrzewnowej myszy po implantacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włókna z dibutyrylochityny nie wykazują działania toksycznego, nie wywołują zmian ogólnoustrojowych oraz nie wywołują istotnego wzrostu poziomu cytokin IL-1 β i IL-6 po implantacji włókien z DBCH na okres 7, 14, 21, 28 i 60 dni. Implantowane do jamy otrzewnowej, wywołują dość nasilony odczyn zapalny.

Słowa kluczowe: dibutyrylochityna, badania biologiczne in vitro, badania implantacyjne, interleukina 1β i 6.

Chityna szeroko rozpowszechniony w przyrodzie polisacharyd, jest praktycznie nierozpuszczalna w rozpuszczalnikach organicznych, w związku z czym jej praktyczne zastosowanie jest bardzo utrudnione. W badaniach bioaktywności chityny stwierdzono, że między innymi przyśpiesza ona gojenie ran nie wywołując żadnych reakcji ubocznych w organizmie ludzkim . Chityna byłaby idealnym materiałem opatrunkowym, gdyby istniał dogodny rozpuszczalnik umożliwiający jej przetwórstwo. Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania dibutyrylochityny pośrednio rozwiązuje ten problem. Do syntezy dibutyrylochityny zastosowano chitynę krylową produkcji Instytutu Morskiego i Rybackiego w Gdyni. Produkt wyjściowy był dodatkowo oczyszczony z pozostałości węglanu wapnia poprzez 2-godzinną obróbkę w 2 N wodnym roztworze HCI w temperaturze pokojowej. Odłączoną chitynę myto wodą, zobojętniano roztworem wodorotlenku amonu, myto wodą i acetonem, odsączano i suszono. Do butyrylizacji użyto chitynę o stopniu acetylacji 0,983 lepkości istotnej (oznaczonej w roztworze N-metylopirolidonu + 5% LiCl) 18,0 dL/g). Jako medium estryfikacji chityny zastosowano mieszaninę bezwodnika masłowego i 72% kwasu nadchlorowego. Reakcję prowadzono w warunkach heterogenicznych [1-4]. Otrzymano oczyszczoną DBCH w ilości 92% produktu estryfikacji chityny.

Analiza elementarna otrzymanego produktu estryfikacji, wykazała, że zawiera on:

C - 55,75%, H - 7,50% i N - 4,10%. Teoretyczna zawartość tych pierwiastków w molu podstawowym DBCH wynosi: C - 55,98%, H - 7,29% i N - 4,08%. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że stopień butyrylizacji badanego polimeru wynosi 2. Budowę chemiczną DBCH potwierdzono również analizą widm chityny i DBCH otrzymanych metodą spektrofotometrii w podczerwieni (RYS.1). Widma IR rejestrowano na spektrofotometrze Perkin-Elmer 2000 FT-IR [2].

Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiacje, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach ewentualnego zastosowania do celów biomedycznych.

Włókna z DBCH uformowano metodą mokrego przędzenia z 16,3% roztworu polimeru w DMF na zwykłym zestawie laboratoryjnym, stosowanym do przędzenia włókien wiskozowych. Otrzymane włókno charakteryzowało się dibutyrylchitin fibres.

- Our investigation included: 1. Biological properties of aqueous extracts:
- · cytotoxicological effect;
- · haemolytic effect;
- · intracutaneous reactivity test.
- 2. Evaluation after implantation:

· evaluation of tissue reaction after mouse intraperitoneal implantation;

 \cdot assessment of the changes in the level of cytokines IL 1 β and IL 6 in the intraperitoneal liquids of mice after implantation.

In the conclusion we can say that the dibutyrylchitin fibres do not have any toxicological properties, they give neither local nor all body reactions. They do not cause significant increase in the level of interleukins IL-1 β or IL-6. After implantation into mouse peritoneal cavity the fibres caused fairly intense inflammation.

Key words: dibutyrylchityn, biological investigation in vitro, evaluation after implantation, interleukin 1β and 6.

Chitin, a widespread natural polysaccharide, is practically insoluble in organic solvents, so that industrial applications are very troublesome. During the evaluation of the chitin bioactivity it was found that it activated the process of wound healing without any side reactions in the human body. This natural polymer would be used as an ideal material promoting wound healing if simple methods of preparation of dressing materials from practically insoluble chitin were known. To some extent this problem was solved by a new procedure elaborated at the Department of Physical Chemistry of Polymers at Lodz Technical University. For the preparation of dibutyrylchitin, krill chitin - the product of The Sea Fisheries Institute in Gdynia - was used. The initial product was additionally purified by extraction of residual calcium carbonate by treatment of chitin powder with 2N HCl over a period of 2 h at room temperature. The chitin was next washed with water, neutralised with ammonia solution, washed again with water, acetone and dried.. Butyric anhydride was used for esterification of chitin and 72 % perchloric acid was used as a catalyst of reaction conducted in heterogeneous conditions [1-4].

The yield of DBCH dried in a hot-air stream was 92 %. Elemental analysis of the obtained chitin ester gave C -55.75%, H - 7.50% and N - 4.10%; theoretical values calculated for dibutyrylchitin are: C -55.98%, H - 7.29% and N - 4.08%. The obtained results suggested that the degree of chitin butyrylation was equal to 2. Chemical structure of DBCH was confirmed by infra-red (IR) spectroscopic investigations (FIG.1). IR spectra of DBCH and chitin were recorded from film samples using a Perkin-Elmer 2000 FT-IR [2].

Excellent properties of dibutyrylchitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine.

DBCH fibres were prepared using 16.3% solution of polymer in DMF in a laboratory set-up. The obtained fibres had titre value of 1.86 dtex, tenacity of 14.8 cN/tex (in dry state) and elongation of 7.4% (in dry state) [3].

masą liniową 1,86 dtex, wytrzymałością właściwą w stanie suchym 14,8 cN/tex i wydłużeniem 7,4% [3].



FIG. 1. IR spectra of chitin (1) and DBCH (2) films.

Metody badań

Badania wyciągów wodnych

Wyciągi wodne z badanych włókien przygotowano w oparciu o ogólne wymagania z zachowaniem w proporcji 6 g włókien na 100 ml wody badane włókna. podwójnie destylowanej. Próby inkubowano w temp. 343 K przez 24 h. Do badań biologicznych wyciągi wodne doprowadzano do izotoniczności stałym chlorkiem sodu. Jako roztwór kontro-Iny zastosowano wodę podwójnie destylowaną inkubowaną w tych samych warunkach co badane próby [5-7].

Pomiary laboratoryjne wyciągów wodnych Oznaczanie pH

Pomiar pH przeprowadzono w temperaturze 293 K z zastosowaniem mikroprocesorowego miernika pH/ mV°C z automatyczną kompensacją temperatury typ P-731 produkcji polskiej, stosując typową elektrodę kombinowaną typ SAqP-301 W, krajowej produkcji [8].

Oznaczenie przewodności elektrycznej właściwej

Oznaczenie przewodności elektrycznej właściwej wykonano przy użyciu konduktometru typ N-572 produkcji polskiej z elektrodą typu PS-2Z. Przewodność elektryczną właściwą wyciągów wodnych (µS/cm) mierzono w temperaturze 293 K [9].

Oznaczenie suchej pozostałości

50 ml z każdego wyciągu zlewano do tygla kwarcowego wysuszonego do stałej masy i odparowano na łaźni wodnej. Tygiel wraz z otrzymanym osadem suszono w temperaturze 378 K do chwili, gdy różnica przy kolejnym ważeniu nie przekraczała 0,2 mg. Suchą pozostałość po odparowaniu obliczono jako różnicę między próbą badaną ,a kontrolną (wynik przeliczono na 100 cm³ wyciągu) [10].

Badania biologiczne wyciągów wodnych Badanie działania hemolitycznego

Ocenę działania hemolitycznego wyciągów wodnych przeprowadzono poprzez oznaczenie odsetka hemolizy: użyto 10% zawiesiny erytrocytów, które inkubowano z wyciągiem w temperaturze 310 K przez 24 h. Pomiary absorbancji wykonano w spektrofotometrze Marcel s 330 [11].

Methods

Aqueous extracts investigation

The aqueous extracts from the tested fibres were prepared in accordance with a general procedure, the proportions being 6 g of fibres per 100 ml of bidistilled water. The samples were incubated at the temperature of 343 K for 24 h. For biological tests the aqueous extracts were made isotonic by an addition of solid NaCl. The bidistilled water incubated under the same conditions was used as a control sample [5-7].

Laboratory measurements of aqueous extracts. Assessment of pH

Measurements of pH were made at the temperature of 293 K with the use of microprocessor pH/mV°C-meter with an automatic temperature compensation, model P-731, made in Poland. Standard combined electrode, model SAqP-301, of Polish make was used [8].

Electrical conductivity

The measurements of electrical conductivity were carried out with a conductometer, model N-572, Polish make, with an electrode model PS-2Z. The electrical conductivity of aqueous extracts (μ S/cm) was measured at the temperature of 293 K [9].

Dry residue.

A 50ml sample of each aqueous extract was put into a quartz crucible dried to constant weight and was evaporated in a water bath. The crucible containing the residue was dried at the temperature of 370 K to the point when the weighing difference did not exceed 0.2 mg. The dry residue, after evaporation, was calculated as difference between the tested and control sample and results were recalculated for 100 cm³ of the extract [10].

Biological evaluation of aqueous extracts. Haemolytic effect.

The evaluation of haemolytic effect was carried out by assigning the haemolytic proportions. The 10% suspension of erythrocytes, incubated together with the extracts at the temperature of 310 K over the period of 24h, was used. Absorbance was measured using the Marcel S 330 spectrophotometer [11].

Badanie działania toksycznego na plemniki buhaja

Badania przeprowadzono stosując nasienie buhaja mrożone w ciekłym azocie. 0,1 cm³ (zawierający około 10 mln plemników) mrożonego nasienia rozmrażano w 1 cm³ badanego wyciągu wodnego i w 1 cm³ roztworu kontrolnego podgrzanych do temperatury 312 K [12]. Ocenę przeprowadzono porównując czas przeżycia plemników w próbie badanej i kontrolnej według następującej skali:

"-" brak działania toksycznego (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli równa i mniejsza od 15%).

"+" małe działanie toksyczne (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli większa od 15% i równa lub mniejsza od 20%).

"++" duże działanie toksyczne (różnica pomiędzy czasem przeżycia plemników w próbie i kontroli większa od 20%).

Badanie odczynowości śródskórnej

Badanie przeprowadzono na królikach rasy Albinos, o wadze około 3kg. Uprzednio wydepilowanym na grzbiecie zwierzętom wstrzykiwano śródskórnie po lewej stronie kręgosłupa w 5 miejscach po 0,2 ml badanego wyciągu wodnego, a po stronie prawej w 5 miejscach po 0,2 ml roztworu kontrolnego. Zmiany zabarwienia skóry oraz wielkość odczynu w miejscach wstrzyknięć oceniano po 24, 48 i 72 godzinach [13].

Badania implantacyjne

Badania odczynu tkanek i ocenę poziomu cytokin po implantacji włókien z dibutyrylochityny (sterylizacja - tlenek etylenu) przeprowadzono w porównaniu do nici Maxon prod. Davis+Geck.

Badanie odczynu tkanek

Operacje przeprowadzono na sześćdziesięciu - 10 tygodniowych myszach szczepu BALB/C, samicach o wadze około 20 g. Zabiegi wykonywano w znieczuleniu eterowym. Do jamy otrzewnowej implantowano włókna DBCH i nici chirurgiczne Maxon 4/0 w postaci pętli o masie 0,13 g. Badania patomorfologiczne przeprowadzono po 7, 14, 21, 28 i 60 dniach po implantacji. Preparaty do oceny mikroskopowej barwiono hematoksyliną i eozyną [14].

Badanie poziomu cytokin IL-1 β i IL-6

Poziom cytokin w płynie z jamy otrzewnowej myszy oceniano 7, 14, 21, 28 i 60 dnia po implantacji włókien z DBCH, w porównaniu do zwierząt, którym implantowano nici Maxon oraz do zwierząt poddanym zabiegowi otwarcia i zamknięcia jamy otrzewnowej bez implantacji materiału oraz do zwierząt zdrowych. Do oceny zastosowano test Endogen Mouse Interleukin-1 β i 6 Elisa [15].

Wyniki badań

Wyciągi wodne

Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych

Otrzymane wyciągi wodne były bezbarwne, klarowne i bez zapachu. Średnia wartość pH wyciągów z DBCH była poniżej zakresu normy 5,5-7,5 jednostek pH. Średnia wartość przewodności elektrycznej właściwej oraz suchej pozostałości mieściły się w granicach normy. Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 1.

Wyniki badań biologicznych

W badaniach biologicznych in vitro wyciągów wodnych nie stwierdzono ich działania hemolitycznego na erytrocyty ludzkie oraz cytotoksycznego na spermatozoidy buhaja. Wyniki badań przedstawiono w TABELI 2.

The evaluation of toxic influence on bull's spermatozoons

The investigation was conducted with the use of the bull sperm frozen in liquid nitrogen. The sample of 0,1 cm³ of the semen (containing approx. 10 million of spermatozoons) was defrozen in 1cm³ of tested extract and 1 cm³ of control extract, both wormed up to the temperature of 312 K [12]. The evaluation was carried out by comparing the survival times of spermatozoons in the tested and control samples by assigning the following symbols:

(-) - lack of toxic effect (the difference in survival time did not exceed 15%)

(+) - low toxic effect (the difference in survival time between 15% and 20%)

(++) - strong toxic effect (the difference in survival time higher then 20%)

Intracutaneous reactivity test

This test was carried out on the albino rabbits of the average weight of 3 kg. The skin was prepared by hair depilation and proper disinfecting. On the left side the intracutaneous injection of 0.2 ml of tested extract was made in five points. The right side was used for the control injection in the same way. The changes in skin colour and its reaction in the injection places were estimated after 24, 48 and 72 hours [13].

Evaluation after implantation

Evaluation of the tissue reaction and the level of interleukins after implantation of DBCH fibres (sterilised with ethylene oxide) was done in comparison with the Maxon sutures (D&G, Cyanamid Co., USA).

Evaluation of tissue reaction after implantation

The surgery was carried out on the 60 female mice of the BALB/C breed at the age of 10 weeks and average weight of 20g in general ether anaesthesia. Loops of DBCH fibres and Maxon sutures weighing approx. 0.13g were implanted into peritoneal cavity. The pathomorphological evaluation was done 7, 14, 21, 28 and 60 days after implantation. Specimens for microscopic studies were prepared with the H&E method [14].

Assessment of interleukins IL 1 β and IL 6

The level of interleukins in the mice intraperitoneal liquid was determined 7, 14, 21, 28 and 60 days after the implantation of DBCH fibres and compared with the results obtained for animals after implantation of the Maxon sutures and for the control animal group which underwent the same surgical procedure without implantation and for the second control group of healthy animals. The Endogen Mouse Interleukin-1 β and 6 Elisa tests were used in this study [15].

Results

....

Aqueous extracts

Results of laboratory measurements

The obtained aqueous extracts were colourless, clear and odourless. The mean pH of aqueous extracts of DBCH was under the standard range of 5.5-7.5 pH. The mean values of electrical conductivity and dry residue were within the standard limits. The results are shown in TABLE 1.

Results of biological evaluation

In the "in vitro" biological evaluation of aqueous extracts, neither the haemolytic effect on human erythrocytes nor the cytotoxic influence on bull spermatozoons was stated. The results are shown in TABLE 2. 56

Wyciąg z DBCH Extract from DBCH	рН	Przewodność elektryczna Electrical conductivity [µScm ⁻¹]	Sucha pozostałość Dry residue [g]
1	4,98	41,0	0,0066
2	5,02	38,0	0,0008
3	5,05	26,0	0,0033
średnia/mean	5,01	35,0	0,0036
kontrola/control	6,25	3,0	-

TABELA 1. Wyniki badań laboratoryjnych.

TABLE 1. Results of laboratory tests of aqueous extracts.

Wyciad	Działanie	Działanie cytotoksyczne na plemniki buhaja Toxic influence on bull's spermatozoons						
z DBCH Extract from DBCH	hemolityczne Haemolytic effect [%]	Czas przeżycia w próbie Survival time in the sample [min]	Różnica pomiędzy czasem przeżycia w próbie i kontroli Difference in survival time [%]	Stopień toksyczności Toxicological level				
1	0,68	70	12,5	brak/lack				
2	0,70	80	0,0	brak/lack				
3	0,60	75	6,25	brak/lack				
średnia/mean	0,66	75	6,25	brak/lack				
kontrola/control		80	-	-				

TABELA 2. Wyniki badań biologicznych in vitro wyciągów wodnych.

TABLE 2. Results of biological tests in vitro of aqueous extracts.

Wyniki badań odczynowości śródskórnej

W miejscu iniekcji wyciągów z DBCH w dwóch miejscach zaobserwowano łagodny rumień, który utrzymywał się przez 48 godzin. Obliczony Wskaźnik Pierwotnego Drażnienia wyciągów był bez znaczenia. Iniekcja badanych wyciągów nie wywoływała stanów zapalnych skóry. Wyniki badań przedstawiono w TABELI 3.

Results of intradermal reactivity evaluation

At two injection sites of DBCH mild erythemas were observed for 48 hours. The calculated WPD of the extracts was of no importance. The injections of aqueous extracts did not cause any inflammatory changes in the skin. The results are shown in TABLE 3.

Miejsce iniekcji	Ocena śródskórnego działania drażniącego Evaluation of intradermal reactions.							
Injection	24	h	48	h	72	-		
site	rumień erythema	obrzęk oedema	rumień erythema	obrzęk oedema	rumień erythema	obrzęk oedema	points	
1	1	0	1	0	0	0	2	
2	0	0	0	0	0	0	0	
3	1	0	1	0	0	0	2	
4	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	
razem/ total	2	0	2	0	0	0	4	

Wskaźnik Pierwotnego Podrażnienia = 4/ 15 = 0,26 Primary irritation index = 4/15 = 0,26

TABELA 3. Wyniki badań odczynowości śródskórnej.

TABLE 3. Results of intradermal reactivity test.

BIMATERIAtow

Wyniki badań implantacyjnych

Badania makroskopowe

RYS. 2. Obraz makrosko-

dibutyrylochityny do

myszy. W centrum

widoczny wszczep po-

dni

otrzewnowej

białoróżową

włókien

po

60

powy

jamy

kryty

tkanką.

implantacji

7 dni po implantacji włókien z dibutyrylochityny, po otwarciu jamy otrzewnowej u wszystkich sekcjonowanych myszy, stwierdzono dość silne przekrwienie całej sieci i otrzewnej trzewnej. Włókna w postaci kłębuszka oklejone były siecią. 14 dnia po zabiegu w jamie otrzewnowej obserwowano większą ilość klarownego, czerwonego płynu . 21 i 60 dni po operacji tkanka otaczająca implant była dość gruba, silnie przerastała włókna i zawsze była połączona mostkiem plazmatycznym z siecią. Pozostałe narządy jamy brzusznej jak jelita, wątroba, żołądek, śledziona nie wykazywały zmian o charakterze patologicznym (RYS.2).

Results of evaluation after implantation

Macroscopic evaluation

7 days after the implantation of DBCH fibres in all sacrificed mice there was significant congestion of omentum and peritoneum wall. The fibre loops were covered with the omentum. After 14 days greater volume of clear, reddish liquid were found in the peritoneal cavity. On 21st day and 60th day the tissue surrounding the implants was thick, strongly penetrated the filaments of the fibres and was connected with omentum by plasmatic bridge. Other internal organs and tissues of the sacrificed mice did show any pathological changes (FIG.2).



FIG. 2. Macroscopic view 60 days after implantation of DBCH fibres into mice peritoneal cavity. The implant is in the middle covered with a pinkish-white tissue.

U wszystkich zwierząt, którym implantowano nić Maxon stwierdzono, że w odróżnieniu od włókien z DBCH, leżała ona luźno wśród jelit i z łatwością dawała się usunąć. W 7 dniu w jamie otrzewnowej stwierdzono obecność krwistosurowiczego płynu, a 14 dnia po zabiegu operacyjnym powierzchnia nici Maxon pokryta była miejscami białawą, przejrzystą bardzo cienką błonką. 21, 28 i 60 dniu wytworzona tkanka pokrywała całą powierzchnię nić, którą z łatwością można było usunąć z jamy otrzewnowej. Narządy jamy brzusznej nie wykazywały zmian o charakterze patologicznym (RYS.3). Loops of the Maxon sutures found in the peritoneal cavity were always loose and easy to remove. After 7 days the presence of bloody liquid in the peritoneal cavity was observed. After 14 days the Maxon sutures were partially covered with a transparent, very thin membrane. After longer implantation periods the tissue covered all the surface of the sutures. Other internal organs and tissues of the sacrificed mice did show any pathological changes (FIG.3).

RYS. 3. Obraz makroskopowy 60 dni po implantacji nici Maxon do jamy otrzewnowej myszy. Widoczny fragment nici pokryty przejrzystą, cienką błonką.



FIG. 3. Macroscopic view 60 days after implantation of the Maxon sutures into mice peritoneal cavity. The suture is covered with a thin transparent membrane.

Badania mikroskopowe

W preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną wykonanych 7 i 14 dni po implantacji włókien z DBCH, obserwowano ciemnoróżowe skupiska bezpostaciowe, wokół których widoczne było duże nagromadzenie makrofagów, jednojądrzastych komórek typu limfocyta oraz komórek plazmatycznych, gdzieniegdzie występowały drobne ogniska granulocytów wielopłatowych obojętnochłon-

Microscopic evaluation

7 and 14 days after the implantation of DBCH fibres in the histological specimens dyed by H&E method, there were dark pink amorphic conglomerates surrounded by numerous macrophages, mononuclear cells of lymphocyte type, as well as the plasmatic cells. There were also places with small quantity of polymorphonuclear neutrophiles. On the edges of the sutures observed were capsules of young con-

MATERIAŁO

nych. Na obrzeżach włókien widoczne były fibroblasty oraz pojedyncze fibrocyty tworzące młodą torebkę łącznotkankową. W opisywanej tkance łącznej występowały włosowate naczynia krwionośne, wypełnione elementami morfotycznymi krwi. Między poszczególnymi włóknami dibutyrylochityny obserwowano duże ilości wyługowanych erytrocytów . Brzeżne partie implantu ulegały resorpcji, a w ich miejscu obserwowano puste wakuole, ograniczone przez fibroblasty. W pobliżu pustych przestrzeni widoczne były liczne komórki olbrzymie typu ciała obcego. W obserwacjach późniejszych tj. 21. 28 i 60 dnia po zabiegu stwierdzono pomnożenie tkanki łącznej w miejscach po zresorbowanej dibutyrylochitynie (RYS.4). This connective tissue was overgrown with capillary vessels. The DBCH fibres at the edges underwent resorption and vacuoles formed instead, surrounded by fibroblasts and some foreign-body-type cells. After longer observation periods (21, 28 and 60 days) at the sites of resorbed DBCH there was found a proliferated connective tissue (FIG.4).

RYS. 4. Obraz mikroskopowy 60 dni po implantacji dibutyrylochityny do jamy otrzewnowej myszy. Widoczne miejsca po zresorbowanych włóknach wypełnione luźną tkanką łączną (H&E, 140x).

7 i 14 dni po implantacji nici Maxon w preparatach widoczne były ogniskowe nagromadzenia komórek jednojądrzastych typu limfocyta oraz niewielkie ilości wysięku włóknikowego.

21, 28 i 60 dnia widoczne były przekroje nici otoczone cienkim pasmem tkanki łącznej, nie przekraczającej 1 średnicy nici (RYS.5). FIG. 4. Microscopic view 60 days after implantation of DBCH fibres into mice peritoneal cavity. The sites after absorbed sutures are filled with a connective tissue (H&E, 140x).

In the specimens prepared 7 and 14 days after the Maxon suture implantation there were local agglomerates of mononuclear cells of lymphocyte type as well as small volumes of fibrin exudate. After 21, 28 and 60 days the fibres were surrounded by a thin layer of connective tissue, which thickness did not exceed 1 suture diameter (FIG.5).

Interleukin levels in the liquid from mice peritoneum cavity



FIG. 5. Microscopic view 60 days after implantation of the Maxon suture. The cross-section of the suture covered with a connective tissue is seen (H&E, 160x).

MATERIAŁOW

Wyniki badań poziomu cytokin Wyniki badań poziomu cytokin w jamie otrzewnowej poddano analizie statystycznej z zastosowaniem programu Statistica 5.0. Przyjęto poziom istotności p < 0,05.

Na podstawie badań przeprowadzonych 7 dnia po zabiegu nie stwierdzono istotnego wzrostu poziomu IL-1 β w grupie zwierząt z implantowanymi włóknami z DBCH i nićmi Maxon w porównaniu do kontrolnej grupy operacyjnej. W 14 i 21 dobie nastąpił istotny wzrost poziomu IL-1 β zarówno w grupie z DBCH jak i w grupie z Maxonem. W terminach późniejszych poziom IL-1 β nie różnił się statystycznie od grup kontrolnych. The determined interleukin levels were statistically analysed with the use of programme Statistic 5.0. The adopted significance level, p, was < 0.05.

The assessment done on 7th day did not show any significant increase of the level of IL-1 β in the animal group with the implanted DBCH fibres or the Maxon sutures, in comparison with the level observed in the control group after the surgery. An important increase of the IL-1 β level was stated after 14 and 21 days in both groups with implanted DBCH fibres and Maxon sutures. After longer periods the level of IL-1 β was not statistically different from that of both control groups.

Poziom IL-6 w grupie zwierząt z nićmi Maxon był statystycznie wyższy niż w kontrolnej grupie operacyjnej w 7, 14 i 21 dobie po implantacji. W 28 i 60 dobie nastąpił spadek poziomu IL-6 i nie różnił się on statystycznie od poziomu IL-6 w kontrolnej grupie operacyjnej. W grupie zwierząt z implantowanymi włóknami z DBCH istotny wzrost IL-6 stwierdzono 14, 21 i 60 dnia po implantacji Wyniki badań przedstawiono w TABELI 4 i 5.

Omówienie wyników badań

Korzystne własności fizyczne i chemiczne dibutyrylochityny tj. własności błono- i włóknotwórcze, dobra rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność i odporność na gamma radiację zachęciła nas do przeprowadzenia badań biologicznych . Badania te miały na celu ocenę przydatności dibutyrylochityny jako materiału medycznego.

W badaniach biologicznych wyciągów wodnych włókien z DBCH stwierdzono, że nie wywołują one działania hemolitycznego, cytotoksycznego i śródskórnego działania drażniącego.

W badaniach biodegradacji dibutyrylochityny w obecności lizozymu stwierdzono, że proces ten zachodzi na powierzchni włókna z bardzo małą szybkością, a jej mechanizm polega na odrywaniu krótkich łańcuchów od makrocząsteczek polimeru [16]. Na tej podstawie do kontrolnych do badań implantacyjnych wybrano nici Maxon o przedłużonym okresie resorpcji.

W badaniach poziomu interleukin IL-1 β i IL-6 nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami zwierząt z włóknami z DBCH i nićmi Maxon. Jedynie utrzymująca się w 60 dobie po implantacji istotna różnica w poziomie IL-6, spowodowana jest prawdopodobnie toczącym się procesem biodegradacji włókien z DBCH.

W badaniach patomorfologicznych stwierdzono różnice ilościowe i jakościowe odczynu tkanek. Włókna z dibutyrylochityny w okresie 60 dni po implantacji wywoływały miejscowy, dość nasilony, przewlekły, nieswoisty odczyn zapalny. Charakteryzował się on wydłużoną fazą wysiękowokomórkową występującą przez cały okres w pobliżu niezresorbowanych włókien. Faza proliferacyjna rozpoczyna się już w 7 dniu po implantacji i trwa przez cały okres badań. Powstała młoda tkanka łączna wypełniała miejsca po nierównomiernie resorbującej się dibutyrylochitynie. W tkance tej oprócz fibroblastów, fibrocytów i ogniskowo nagromadzonych komórek zapalnych (granulocyty, makrofagi, limfocyty) występują w dużej ilości komórki olbrzymie typu ciała obcego. W odróżnieniu od włókien z DBCH nici Maxon wgajają się poprzez krótkotrwałą i mało nasilona faze wysiękową trwającą około 14 dni. W 14 dniu wytwarza się wokół nich cienka torebka łącznotkankowa, w której nie stwierdzono komórek zapalnych.

Tak istotne różnice w odczynie tkanek obu materiałów, prawdopodobnie spowodowane są różnym czasem i charakterem resorpcji. Problem ten może być wyjaśniony poprzez przeprowadzenie badań odczynu innych tkanek w terminach odległych, tj. dłuższych niż 60 dni, aż do momentu całkowitej resorpcji włókien z dibutyrylochityny. In general the levels of IL-6 in the animal group with implanted Maxon sutures were statistically higher than in the control group after surgery, 7, 14 and 21 days after the implantation. After 28 and 60 days the level of IL-6 decreased and was not statistically different from that of the control group after surgery.

The group of animals with implanted DBCH fibres showed a significant increase in the IL-6 level 14, 21 and 60 days after the implantation. The results are shown in TABLES 4 and 5.

Summary

The beneficial physical and chemical properties of dibutyrylchitin, such as membrane and fibre inductivity, good solubility in organic solvents, bioactivity and resistance to gamma irradiation, have encouraged us to undertake its biological evaluation. The aim of this investigation was to assess the usefulness of dibutyrylchitin as a medical material.

During the biological evaluation of aqueous extracts of DBCH fibres we have confirmed that they give neither haemolytic nor cytotoxic reaction nor intradermal irritation effects.

In the initial evaluation of biodegradation of DBCH in presence of lysozyme it has been found that the degradation process is slow and limited to the surface layer of the fibre. It consists in separation of short chains from the macromolecule of the polymer. Therefore the Maxon sutures characterised by a prolonged resorption time were selected as control samples for the implantation.

The levels of IL-1 β and IL-6 did not show any significant differences in the groups of animals with the implanted DCBH fibres and Maxon sutures. The significant differences in the level of IL-6 observed 60 days after the implantation are probably caused by the biodegradation process.

In the pathomorphological evaluation some quantitative and qualitative differences were stated in the tissue reaction. After 60 days the DBCH fibres caused local non-specific prolonged inflammatory reaction. It was characterised by a prolonged fibroplasia-proliferative phase, which lasted all the time around the non-absorbed fibres. The proliferative phase started 7 days after the implantation and lasted all the investigated time. The developed young connective tissue filled the empty spaces after resorption of DBCH. In this tissue, apart from fibrocytes and fibroblasts and conglomerates of inflammatory cells, there were numerous cells of the foreign-body type. Unlike DBCH fibres, the Maxon sutures healed through short and low-intensity exudative phase, lasting 14 days. After that the sutures were surrounded by a thin capsule of connective tissue which did not contain any inflammatory cells.

The important differences in the reaction of tissues after the implantation of both materials are probably caused by different time and character of resorption. This hypothesis can be verified in further studies of tissue reaction after time intervals longer than 60 days up to complete resorption of DBCH fibres.

References

Piśmiennictwo

[1]. L.Szosland, G.Janowska: Sposób otrzymywania dibutyrylochityny. Patent PL 169077 B1 (1996).

[2]. L.Szosland: Synthesis of highly substituted butyrylchitin in the presence of perchloric acid. J.Bioactive and Compatible Pol. 11, (1996), 61-71.

[3]. L.Szosland, W.Stęplewski: Shear viscosity of dibutyrylchitin dopes and wet spinning of dibityrylchitin fibres. Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, ed. Polish Chitin Soc. vol. IV, (1998), 9- 15.

[4]. L..Szosland L.: Alkaline hydrolysis of dibutyrylchitin: Kinetic and selected properties of hydrolysis products. Fibres & Textilies in Eastern Europe. 4, (1996), 6-79.

[5]. Achmatowicz T., Mazurek A.P.: Stan prawny, wymagania oraz sposoby postępowania w procesie rejestracji lub dopuszczania do stosowania materiałów medycznych. Zastosowanie polimerów w nowoczesnych technikach medycznych. Materiały Seminarium, Ustroń, (1997).

[6]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Ocena i badania. Norma ISO 10993-1, (1997).

[7]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności; metody in vitro. Norma ISO 10993-5, ([1992).

[8]. Polska Norma 86/C-04963: Oznaczanie pH wodnych roztworów produktów chemicznych.

[9]. Polska Norma 76/C-89291: Oznaczanie przewodności elektrycznej - właściwej wyciągu wodnego.

[11]. Borzemska M. : Badania porównawcze metod oznaczania działania hemolitycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych. Polimery w Med. 8, 2, (1978), 57-61.

stałości

...........

[12]. Paluch D. :Badania porównawcze in vitro działania toksycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych w testach biologicznych na żywych komórkach. Polimery w Med.12, 3-4, (1981), 79-119.

[10]. Polska Norma 91/2-55202 : Oznaczanie suchej pozo-

[13]. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania działania drażniącego i uczulającego. Norma ISO 10993-10. (1995).

[14]. Staniszewska-Kuś J., Rutowski R., Paluch D.: Badanie odczynu tkanek na nici chirurgiczne z zastosowaniem własnej metody punktowej. Polimery w Med., 27, 1-2, (1997), 3-16.

[15]. Misterka S., Paluch D., Żywicka B., Staniszewska-Kuś J., Pobiedzińska J.; Zmiany w poziomie interleukiny-1- β *i* interleukiny-6 po implantacji wybranych materiałów medycznych. Doniesienie wstępne. Polimery w Med., 28, 1-2, (1998), 15-24.

[16]. Szosland L., Szumilewicz J.: Bioaktywne właściwości dibutyrylochityny. Postęp w chemii i zastosowaniu chityny i jej pochodnych. Monografia, t.III. (1997), 75-80.

KRAJOWE PROCEDURY NORMALIZACYJNE DOTYCZĄCE BIOMATERIAŁÓW NA PRZYKŁADZIE NORMY ISO-10993: BIOLOGICZNA OCENA WYROBÓW MEDYCZNYCH

LESZEK SOLSKI*, DANUTA PALUCH* LESZEK KRZYWOSIŃSKI**

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu **Polski Komitet Normalizacyjny, Zespół Zagadnień Ogólnych, Ochrony Zdrowia i Środowiska w Warszawie

BICMATERIALOW

W oparciu o ustawę z kwietnia 1993 roku, z dniem 1 stycznia 1994 roku wprowadzone zostały zmiany w systemie normalizacji w Polsce, zgodne z zaleceniami Unii Europejskiej. Jednostką podstawową stał się Polski Komitet Normalizacyjny (PKN), powoływany i nadzorowany przez premiera. W ramach PKN ustanowione zostały Normalizacyjne Komisje Problemowe (NKP), których zadaniem jest prowadzenie bezpośrednich prac normalizacyjnych w określonej grupie tematycznej. Przykładem takiej struktury jest NKP nr 247 - zajmująca się materiałami medycznymi i biomateriałami. Aktualnie członkami tej komisji pozostaje 26 osób reprezentujących różne środowiska naukowe z terenu całego kraju.

POLISH STANDARISATION PROCEDURES RELATED TO BIOMATERIALS ON THE PARTICULAR EXAMPLE OF ISO-10993: BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES

LESZEK SOLSKI*, DANUTA PALUCH*, LESZEK KRZYWOSIŃSKI**

*INSTITUTE OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH

WROCLAW UNIVERSITY OF MEDICINE ** POLISH COMMITTEE FOR STANDARDIZATION, DEPT. OF HEALTH AND ENVIRONMENTAL PROTECTION

Following the law created by Polish Parliament in April 1993, since the 1st January 1994, a number of important changes were introduced in standardisation procedures in Poland, in accordance with the recommendations of EU. The Polish Committee for Standardisation was established under a direct supervision of the Prime Minister. Within this general body there were established several sub-committees known also as working groups (NKP), each dealing with one particular subject or a complex of related subjects. The working group no 247 was established for biomedical devices and biomaterials. At present there are 26 active members of that body, representing different scientific institutions from all over the country. The main target of that workshop group is to translate, to adopt and to publish as Polish Standard (PN) different International Standards

Podstawą prac ww. Komisji stały się normy EN (Normy Europejskie) oraz normy ISO (Międzynarodowej Organizacji ds. Standaryzacji), które należało przetłumaczyć, opracować, poddać ankiecie i ostatecznie ustanowić jako PN czyli obowiązujące normy krajowe. Programem prac do 2001 roku zostało objętych ponad 150 norm. Okazało się, że zakres tematyczny przewidziany dla NKP nr 247 jest zbyt szeroki, co powoduje opóźnienia we wprowadzaniu Polskich Norm zgodnych z EN i ISO, dlatego też w 1998 roku w biurze PKN złożony został wniosek o powołanie dwóch dodatkowych NKP: ds. materiałów stomatologicznych i ds. sprzętu, narzędzi i medycznych urządzeń mechanicznych, które już rozpoczęły prace w marcu 1999 roku.

W gestii NKP nr 247 pozostają nadal materiały medyczne oraz biomateriały. Pojęcie materiału medycznego zdefiniowane zostało w ustawie z dnia 10 października 1991 (Dz.U. nr 105,poz.452) i obejmuje szeroki asortyment od materiałów i preparatów opatrunkowych, poprzez chirurgiczne materiały szewne po bezpośrednie opakowania materiałów medycznych i środków farmakologicznych. Do materiałów medycznych zaliczana jest też duża grupa surowców i wyrobów przeznaczonych do czasowego lub stałego kontaktu z powłokami i tkankami ciała u ludzi i zwierząt, które najczęściej określane są również mianem biomateriałów.

Jedną z norm, nad częściami której prace NKP nr 247, trwają nadal jest projekt PN-ISO 10993 pod ogólnym tytułem "Biologiczna ocena wyrobów medycznych". Norma ta obejmuje aktualnie 17 odrębnych części, których tłumaczenie, opracowywanie i ustanawianie jest na wielu różnych etapach (TABELA 1). related to the given subject, mainlythe standards of ISO and EN. The programme accepted up to 2001 included more than 150 International Standards. It soon became clear that the general scope for that group was too extensive. Therefore in 1998 the governing body of the Polish Committee for Standardisation decided to establish two new working groups: for medical devices and biomaterials used in dentistry and for technical equipment in medicine. These new sub-committees started work in March 1999.

In this situation all medical devices and biomaterials still remain the principle subject of the working group no. 247. General definition of medical devices was given in Poland in the legislative act of 10th October 1991 (published in Dz.Ust.no 105, clause 452) and it covers a wide range of different materials used in medicine from dressings, through surgical sutures to containers and wrapping boxes for drugs and pharmaceutics. In this definition it is also stated that biomaterials are particular medical devices intended for use in human or animal bodies, in temporary or permanent contact with their internal organs or tissues.

One of the International Standards related to biomedical investigation, with the very broad scope is ISO-10993 under the general title Biological Evaluation of Medical Devices. At the moment of writing this paper, ISO-10993 consisted of 17 separate parts related to different aspects of biological testing. The future parts will deal with other relevant aspects of that general subject. Not all these parts were included in the project proposed for the years up to 2001. Some of them are already translated, adopted and established in Poland, while in the case of others the works are still going on. The names of particular parts of ISO 10993 and present stage of transposition into Polish Standards are given in TABLE 1.

Arkusz1*	Ocena i badanie (w pierwszym wydaniu arkusz ten nosił tytuł: przewodnik do wyboru tectów) *
Part 1*	Evaluation and testing(previously this part was known as Guidance on selection of tests) *
Arkusz 2	Wymagania dotyczące dobrostanu zwierząt
Part 2	Animal welfare requirements
Arkusz 3	Badania genotoksyczności, rakotwórczości i toksycznego wołwy na rozród
Part 3	Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
Arkusz 4*	Wybór badań w kontakcie z krwia*
Part 4*	Selection of tests for interaction with blood*
Arkusz 5	Badania cytotoksyczności: metody in vitro
Part 5	Tests for cytotoxicity: in vitro methods
Arkusz 6*	Badania miejscowych zmian po implantacij*
Part 6*	Test for local effects after implantation*
Arkusz 7	Pozostałości po sterylizacji tlenkiem etylenu
Part 7	Ethylene oxide sterilization residuals
Arkusz 8	(AKTUALNIE BRAK!) Arkusz ten nosi nadal robocza nazwe Badania kliniczne
Part 8	(TEMPORARY VACANT) working title is: Clinical investigation
	Ramowy plan identyfikacji i oznaczania ilościowego potencjalnych produktów degradacji
Arkusz 9	(jak na razie Arkusz ten istnieje jedynie jako Raport Techniczny)
Part 9	Degradation of materials related to biological testing
	(at the moment this part exsits only as Technical Report)
Arkusz 10*	Badania na dražnienie i uczulenia*
Part 10*	Tests for irritatation and sensitization*
Arkusz 11	Badania toksyczności ogólnoustrojowej
Part 11	Tests for systemic toxicity
Arkusz 12	Przygotowywanie próbek i materiały referencyine
Part 12	Sample preparation and reference materials
Arkusz 13	Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji polimerów
Part 13	Identification and quantification of degradation products from polymers
Arkusz 14	Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji ceramiki
Part 14	Identification and quantification of degradation products from ceramics
Arkusz 15	Identyfikacja i oznaczanie ilościowe produktów degradacji metali i stopów
Part 15	Identification and quantification of degradation products from metals and allovs
Arkusz 16*	Planowanie badań toksykokinetycznych produktów degradacji i substancji ługowalnych *
Part 16*	Toxokinetic study design for degradation products and leachables *
Arkusz 17	Pozostałości glutaraldehydowe i formaldehydowe w przemysłowo sterylizowanych wyrobach medycznych
Part 17	Glutaraldehyde and formaldehyde residuals in manufacturer sterilized medical devices

oznaczono normy są już przetłumaczone, choć nie wszystkie z nich zostały już poddane ankiecie i ustanowione jako PN!
 means that these particular parts are already translated into Polish however still are at different stages of transposition

TABELA 1. Arkusze normy ISO-10993 i ich tytuły.

TABLE 1. Parts of ISO-10993 and their titles.

Jak widać z pobieżnego przejrzenia tytułów poszczególnych arkuszy nie układają się one w logiczną całość, która odpowiadała by ogólnie przyjętym schematom postępowania przy kompleksowej ocenie biologicznej wyrobów medycznych. Zadanie ogólnego przewodnika do wyboru testów i rodzajów badań spełnia natomiast arkusz pierwszy ISO 10993 zatytułowany aktualnie jako " Ocena i badanie". Tytuł ten wprowadzony dopiero w 1997 roku wydaje się niezbyt odpowiedni. Ta część normy do momentu aktualizacji nosiła bowiem nazwę: "Przewodnik do wyboru testów" i właśnie takie zadanie ma spełniać nawet pod nowym tytułem. W arkuszu tym przedstawiono i omówiono:

 generalne zasady rządzące biologiczną oceną wyrobów medycznych;

 podział tych wyrobów ze względu na czas trwania i rodzaj kontaktu z organizmem ludzkim;

dobór właściwych metod badań.

Dla osób zajmujących się produkcją, badaniem i rejestracją wyrobów medycznych jedną z najistotniejszych części tego arkusza normy ISO 10993 są wprowadzone ujednolicone definicje oraz praktyczna klasyfikacja.

Podstawowym pojęciem jest **wyrób medyczny**, określony przez ISO 10993 jako:

każdy instrument, aparat, urządzenie, materiał lub inny artykuł, w tym oprogramowanie, który użyty sam lub w połączeniu z innym, został przewidziany przez producenta do zastosowania u ludzi, wyłącznie lub głównie w celu:

- diagnozowania, zapobiegania, monitorowania, leczenia lub ulżenia w stanie chorobowym;

 diagnozowania, zapobiegania, monitorowania, leczenia, ulżenia lub kompensowania w przypadku urazu lub upośledzenia;

 badania, zastępowania lub modyfikacji anatomii lub procesu fizjologicznego;

- kontroli poczęć;

i który nie osiąga swego głównego przewidzianego działania w ciele ludzkim lub na nim środkami farmakologicznymi, immunologicznymi lub metabolicznymi, lecz który może być wspomagany tego rodzaju środkami.

Definicja ta zdecydowanie podkreśla fakt iż wyroby medyczne zasadniczo różnią się od leków a co za tym idzie ich ocena biologiczna wymaga odrębnego, często bardzo swoistego postępowania.

ISO 10993-1 wprowadza też definicję **materiału**, jako: każdego polimeru naturalnego lub syntetycznego, metalu, stopu metali, ceramiki lub innej substancji nieożywionej, włączając w to tkankę pozbawioną funkcji życiowych, użytych jako wyrób medyczny lub jakakolwiek jego część.

Należy zwrócić uwagę na fakt, że w Polsce, wspomniane już wyżej ustawa z 1991 roku (Dz.U. nr 105, poz.452) definiuje dość precyzyjnie i jednoznacznie pojęcie materiału medycznego jako:

 materiały i preparaty opatrunkowe przeznaczone dla celów medycznych i weterynaryjnych oraz środki ich mocowania,

- chirurgiczne materiały szewne,

- materiały stomatologiczne, środki dezynfekujące stosowane w medycynie i weterynarii,

 surowce, półprodukty i wyroby przeznaczone do czasowego lub trwałego stykania się z powłokami ciała, w tym środki antykoncepcyjne, lub pozostawania w tkankach w związku z ich stosowaniem do celów leczniczych, zapobiegawczych bądź diagnostycznych u ludzi i zwierząt (z wyjątkiem instrumentów chirurgicznych i weterynaryjnych),

opakowania bezpośrednie środków farmaceutycznych i materiałów medycznych..

Z porównania definicji ISO **wyrobu medycznego** i krajowej definicji **materiału medycznego** wynika, że aczkolwiek pojęcia te są w większości punktów zbieżne to jednak nie można ich uznać za tożsame. Wydaje się, że definicja As can be seen numbering of these parts is not done according to their logical implementation during the whole procedure of biological evaluation of medical devices. Anyway the most important part is included there as Part 1 - under the title "Evaluation and testing". This particular title was introduced only recently in 1997 and in our opinion is not adequate. Formerly this part had the title "Guidance on selection of test" and even now under the new title the role of this part seems to be that of a general guide to choose the proper test in general design and framework of the whole biological assessment of a medical device.

The ISO 10993 - Part 1 in general describes:

- fundamental principles governing the biological evaluation of medical devices;

- definition of categories of devices according to the nature and duration of contact with the human body;

selection of appropriate tests.

For all the persons involed in designing, production and registration procedures of all types of medical devices the most important of ISO 10993-1 are those giving basic definitions and simple, practical categorization.

By all means the very basic term is: medical device, and this is:

any instrument, apparatus, appliance, material or other article, including software, whether used alone or in combination, intended by the manufacturer to be used for human beings solely or principally for the puropose of:

- diagnosis, prevention, monitoring, treatment or alleviation of disease, injury or handicap;

 investigation, replacement or modification of the nanatomy or of physiological process;

- control of conception;

and which does not achieve its principal intended action in or on the human body by pharmacological, immunological or metabolic means, but which may be assisted in its function by such means.

Such definition very precisely stated that the "devices" are really different from drugs and therefore their biological evaluation requires a different approach. Also it is clear that the term "medical device" includes all dental devices.

ISO 10993-1 gives also a simple definition of **"material"** as:

any synthetic or natural polymer, metal, alloy, ceramic, or other nonviable substance, including tissue rendered nonviable, used as a device or any part of thereof.

This is very important as here in Poland the law of 1991 for regulation of registration procedures and marketing rules for medical materials (Dz.U.nr 105, prov. 452) gives another definition for **"medical materials"**, as:

- all materials and substances for medical and veterinary dressing purposes and devices to them;

- surgical sewing materials;

- dental materials and all disinfectants used in medicine and veterinary;

- all rough substances and ready to use devices intended for temporary contact with body, including devices for conception control, or for staying within the human body in relation to their use in the treatment, prevention or diagnosis in human beings and animals with the exception of medical and veterinary tools;

- direct packaging of pharmacological drugs and medical materials.

Therefore these two definitions could be confused. However, in many points the ISO 10993-1 definition of **"medical device"** is really similar to the specification given by Polish regulation in the definition of **"medical material"**. It seems that the ISO 10993-1 definition of medical device gives a broader scope and is more precise. For example according to ISO 10993-1 definition all the surgical tools (scissors, knives etc.) are of course medical devices, but

62

ISO wyrobu medycznego ma nieco szerszy zakres pojęciowy i jest bardziej precyzyjna. Na przykład w rozumieniu ISO 10993 narzędzia chirurgiczne (m.in. skalpele, haki, zaciski naczyniowe) są jak najbardziej wyrobami medycznymi, podczas gdy w krajowej definicji materiału medycznego zostały wyłączone. Natomiast uznane za materiał medyczny środki dezynfekujące (z czym zresztą trudno się zgodzić!) nie są w ujęciu normy ISO 10993 wyrobem medycznym. Zdecydowanie należy też unikać utożsamiania używanego w normie ISO pojęcia **"materiał**" z krajową definicją **materiału medycznego.**

Wreszcie trzeba też wspomnieć o utrwalonej definicji pojęcia **"biomateriał**", którym jest: każda substancja, inna niż lek, albo kombinacja substancji syntetycznych i naturalnych, która może być użyta w dowolnym okresie, a której zadaniem jest uzupełnienie lub zastąpienie tkanek, narządu albo jego części lub spełnianie ich funkcji. Pojęcie to dość powszechnie stosowane w nazewnictwie i literaturze naukowej (np. w nazwie NKP-247) nie zostało wprowadzone w tej normie ani w prezentowanych definicjach, ani też w zaproponowanym podziale wyrobów medycznych.

ISO 10993-1 wprowadza następującą klasyfikację wyrobów medycznych:

A - według rodzaju kontaktu z organizmem na:

 wyroby kontaktujące się z powierzchnią (skóra, błony śluzowe, powierzchnie uszkodzone)

 wyroby kontaktujące się zewnętrznie (krew, zębina, tkanki miękkie)

 wyroby implantowane czyli wszczepy (krew, tkanki miękkie, kość)

B - według czasu trwania kontaktu na:

 wyroby o ekspozycji ograniczonej, tj. jednorazowy kontakt nie dłuższy niż 24 godz.;

 wyroby o przedłużonej ekspozycji, których użycie wymaga kontaktu stałego dłuższego niż 24godz. lecz krótszego niż 30 dni;

- wyroby o stałym kontakcie, dłuższym niż 30 dni.

Przedstawiona powyżej klasyfikacja wyrobów medycznych na pewno nie jest idealna niemniej wydaje się być dość prosta i wystarczająca dla praktycznego podejścia do wyboru i projektowania badań w biologicznej ocenie wyrobów medycznych.

Podstawowym celem całej normy ISO 10993 jest dobro pacjenta ale także właściwe wykorzystanie zwierząt doświadczalnych. Ograniczenie wykorzystania zwierzat doświadczalnych nie może polegać tylko i wyłącznie na zmniejszaniu ich liczby użytej do badań. Dlatego też omawiany arkusz 1 tej normy zwraca szczególną uwagę na odpowiednie przeanalizowanie i zaplanowanie badań. Takie podejście obejmować powinno zarówno przestudiowanie dostępnych wyników poprzednich badań jak i ogólną analizę proponowanych zastosowań nowego wyrobu, który ma być poddany ocenie. Może się bowiem okazać, że teoretycznie nowy wyrób ma już udokumentowane wyniki badań, które mogą być ekstrapolowane z innych wyników badań wyrobów o zbliżonym charakterze zastosowania i podobnej budowie. W przypadku podjęcia decyzji o przystąpieniu do oceny biologicznej nowego wyrobu w projektowaniu badań i testów należy wziąć pod uwagę przede wszystkim rzeczywiste, proponowane zastosowanie nowego wyrobu, z uwzględnieniem rodzaju kontaktu z organizmem człowieka i czasu jego trwania. Badania stosowane we wstępnej ocenie biologicznej, jakie powinny być wzięte pod uwagę dla wszystkich kategorii wyrobów medycznych i czasów trwania kontaktu przedstawia norma ISO 10993-1 w przejrzystej formie tabelarycznej (TABELA 2).

as such they are definitely exluded from the definition given in Polish regulation and are not regarded as medical materials. On the other hand, according to the Polish regulation the disinfectants are included in medical materials (with which we do not agree) but are not "medical devices" in the sense of ISO 10993-1 definition. Moreover it must be stated that the term "**material**" used in ISO 10993 is not equivalent to **"medical materials**" given by Polish regulation (Dz.U.nr 105, prov.452).

Surprisingly, ISO 10993-1 does not give any description of the general term **"biomaterial"** which is very often used in scientific articles. The biomaterial is regarded as every substance, different than drugs, or combination of synthetic and natural substances, which can be used as replacement or modification of tissue, organs or their parts or in use of their functions. This term however very popular, is not defined by ISO 10993 but fits very well to the given definition of a "medical device".

The ISO 10993-1 gives also simple categories of medical devices.

A - Categorization by nature of contact:

- surface contacting devices (eg. with skin, mucosal membranes, breached or compromised surfaces)

- external communicating devices (eg. with blood path, bone tissue, dentin etc.)

- implant devices (eg. into bone tissue, blood etc.).

B - Categorization by duration of contact:

- limited exposure - devices whose single or multiple use or contact is likely to be up to 24h,

- prolonged exposure - devices whose single, multiple or long-term use or contact is likely to exceed 24h but not 30 days,

- permanent contact - devices whose single, multiple or longterm use or contact exceeds 30 days.

The categories given by that part of ISO 10993 are not ideal but are very practical and simple and seem to be sufficient for designing and biological evaluation of medical devices.

Selection and evaluation of any material or device intended for use in humans requires a structured programme od assessment. In the design process, an informed decision should be made that weighs the advantages and disadvantages of various materials and test procedures. To be sure that the final product will preform as intended and be safe for human use, the programme should include biological evaluation. The ISO 10993-1 gives an easy guidance to select the proper test on the basis of duration of contact time and type of that contact. Such framework is given in TABLE 2.

Due to the diversity of medical devices, it is recognized that not all tests identified in a category will be necessary or practical for any given device. It is indispensable for testing that each device shall be considered on its own merits: additional tests not indicated in the table may be necessary.

BI-MATERIAŁOW

Kla	asyfikacja wyrobów medycznych ze względu n Device categories:	a:		Działanie biologiczne Biological effect								
Rod	zaj kontaktu z organizmem Body contact	Czas trwania kontaktu: A – ograniczony (≤ 24 h) B – przedłużony (24 h do 30 dni) C – stały (powyżej 30 dni) Contact duration: A – limited (≤ 24 h) B – prolonged (24 h to 30 days) C – permanent (over 30 days)	Cytotoksyczność Cytotoxicity	Działanie uczulające Sensitization	Jziałanie drażniące lub reaktywność śródskórna Irritation or intracutaneous reactivity	Toksyczność ogólnoustrojowa (ostra) Systemic toxicity (acute)	ksyczność subchroniczna (toksyczność podostra) Sub-chronic toxicity (sub-acute)	Genotoksyczność Genotoxicity	Implantacja Implantation	Zgodność z krwią Haemocompatibility		
Kategoria Category	Kontakt- Contact						Tol					
	Skóra	A	X	X	X							
and the second second	Skin	В	X	X	Х							
Wyroby kontaktujące		С	X	X	Х							
się z powierzchnia	Błony śluzowe	A	X	X	Х							
ore z powierzennią	Mucosal membranes	В	X	X	Х							
Surface devices		С	X	X	Х		Х	Х				
	Przerwane lub uszkodzone powierzchnie	A	X	X	Х							
	Breached or compromised surfaces	В	X	X	Х							
		С	X	X	Х		Х	Х				
	System krwionośny, pośredni	A	X	X	X	X				X		
Wvroby kontaktujace	Blood path, indirect	В	X	X	X	X				X		
się zewnetrznie		C	X	X		Х	X	X		X		
	Tkanka miękka/	A	X	X	X							
External	Kosc/zębina Tiscus/hons/dontin communication	В	X	X				X	X			
communicating	hssue/bone/dentin communication	C	X	X	X	X		Х	X			
devices	Krążąca krew	A	X	X	X	X		V	X	<u>X</u>		
	Circulating blood	В	X	X	X	X	Y	X	Х			
			X	X	X	X	X	X		X		
	Tkanka miękka i kość	A P	X	X	X			V	V			
Wyroby	Tissue/Bone	C	X	X				X	X			
implantowano		Δ	X	X	Y	Y		~	A V			
Iniplantowane		M			A	~	CINESS STOLEN	CROBINE CONTRACTOR				
implantowane	Krew	B	+ X	X	Y	V		V	V	V		

TABELA 2. Ogólne zalecenia dotyczące wyboru badań w ocenie wstępnej proponowane w normie ISO-10993-1.

TABLE 2. Guidance for initial evaluation tests from ISO 10993-1.

Oczywistym jest, że przy ogromnej różnorodności wyrobów medycznych, nie wszystkie badania nawet w ramach jednej kategorii, będą potrzebne lub możliwe do wykonania dla danego wyrobu. Ważne jest rozważenie cech własnych wyrobu, co może nawet prowadzić do konieczności wykonania badań dodatkowych nie wymienionych w tabeli.

64

IMATERIALOW

Jak wspomniano już powyżej, nadrzędnym celem całości normy ISO 10993 jest ochrona ludzi. Jednak sam arkusz ISO-10993-1 ma służyć też jako podstawa do zaplanowania badań biologicznych w taki sposób, aby zmniejszyć liczbę wykorzystywanych zwierząt i ich stopień oraz czas narażenia na bezpośrednie eksperymenty. W biologicznej ocenie materiałów medycznych znaczącą rolę odgrywają badania na zwierzętach i w aktualnym stanie wiedzy nie da się ich całkowicie wyeliminować. Większość z pozostałych szesnastu arkuszy normy ISO 10993, oczywiście z wyjątkami tych, które dotyczą wyłącznie badań "in vitro", omawia też eksperymenty na zwierzętach. Dlatego musi budzić zdziwienie fakt, że w najbliższych planach pracy komisji NKP-247 nie przewidziano w ogóle tłumaczenia i ustanowienia arkusza nr 2 tej normy, precyzującego wymagania dotyczące dobrostanu zwierząt doświadczalnych. Zgodnie z rozporządzeniem prezesa PKN z października 1998 istnieje możliwość powoływania norm w wersji

The primary goal of ISO 10993 is the protection of humans. However, the role of this particular standard is to serve also as a framework in which to plan such a biological evaluation which minimizes the number and exposure of experimental animals. Currently, biological testing still relies on animal models which could be easily seen on reading all other parts of that specific standard. Therefore, the second part of ISO 10993, known as Animal welfare requirements, is of great importance but this part is not planned for translation into Polish in the nearest future. It could have been accepted as Polish Standard without translation in its original language but even such legislative way was not undertaken. Here in Poland we do have our own legislation passed in 1997 on general protection of animals of which the provisions 20-32 deal with the experimental procedures on animals. But these articles are not in full, proper accordance with the Directive 86/609/EEC. Bearing that in mind it is really very important to establish such animal welfare act as an obligatory Polish Standard in the nearest future.

oryginalnej, ale jak na razie i ta droga nie została wykorzystana. Istnieje co prawda nowa polska ustawa o ochronie zwierząt z 1997, w której jeden rozdział (artykuły 28-32) poświęcony jest procedurom doświadczalnym z użyciem zwierząt. Brak jest jednak nadal szczegółowych przepisów wykonawczych. Ukazało się jedynie rozporządzenie Rady Ministrów z kwietnia 1999r. Dotyczące powoływania i trybu prac Komisji Etycznych. Podjeto też działania mające na celu zbadanie zgodności podstawowej dyrektywy Unii Europejskiej (86/609/EEC - Council Animal Protection Directive), na której prawie w całości oparty jest arkusz 2-ISO 10993, ze wspomnianą już polską ustawą o ochronie zwierząt. Wydaje się, że opublikowanie zasad postępowania ze zwierzętami doświadczalnymi w języku polskim w dokumencie o charakterze PN (Polskiej Normy) powinno nastąpić jak najszybciej.

W naszej ocenie arkusz 1 normy ISO 10993 pozostaje obecnie podstawowym dokumentem, który podaje wskazówki i zalecenia dla wszystkich osób zajmujących się nie tylko właściwymi badaniami biologicznymi wyrobów medycznych, ale także dla ich projektantów, producentów i osób zajmujących się rejestracją. Większość z zaleceń tej normy, jeszcze przed jej oficjalnym przetłumaczeniem i ustanowieniem jako PN, została już wykorzystana w rozporządzeniu MZiOS z dnia 15 grudnia 1993 (Dz.U. nr 6 z dnia 17 stycznia 1994r.) dotyczącym rejestracji i dopuszczania do obrotu środków farmaceutycznych i wyrobów medycznych. Tak więc, choć normy ISO, EN czy nawet ustanowione już jako PN są dobrowolne, to poprzez ujęcie części zaleceń normy ISO 10993-1 w ramach rozporządzenia MZiOS nabierają one charakteru obowiązującego prawa w zakresie biologicznej oceny wyrobów i materiałów medycznych. Warto też podkreślić fakt, że ujednolicenie procedur badawczych stwarza nareszcie możliwość jednoznacznego porównywania wyników badań prowadzonych w różnych ośrodkach badawczych zajmujących się biologiczna oceną wyrobów i materiałów medycznych.

WARSTWY DIAMENTOWE NA IMPLANTACH DLA TRAUMATOLOGII

S. MITURA*, J. MARCINIAK**, P. NIEDZIELSKI*, Z. PASZENDA**

*Instytut Inżynierii Materiałowej i Technik Bezwiórowych , Politechnika Łódzka w Łodzi ** Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Politechnika Śląska w Gliwicach

Streszczenie

Opracowano technikę wytwarzania powłok pasywno - diamentowych na implantach ze stali Cr-Ni-Mo stosowanych w traumatologii. Przeprowadzono badania struktury warstwy oraz jej własności fizykochemicznych w stymulowanych warunkach laboratoryjnych, głównie ze względu na odporność korozyjną. Oceniono także biotolerancję uszlachetnionych implantów w tkankach zwierząt doświadczalnych oraz w badaniach klinicznych. Nowa jakość implantów gwarantuje w pełni dobre cechy użytkowe. Uzyskane wyniki są obiecujące dla perspektywicznych zastosowań klinicznych.

Piśmiennictwo

References

. . 65

(artykuły, normy EN oraz ISO, dyrektywy EEC oraz krajowe akty prawne wymienione w tekście/ articles, EN and ISO standards, EEC directives and Polish law regulations mentioned in the text)

- PN-EN-ISO 10993-1, Biologiczna ocena wyrobów medycznych,

Arkusz 1: Ocena i badanie, (wersja polska); ISO 10993-2, Biological evaluation of medical devices,

Part 2: Animal welfare requirements (wersja angielska);

- Achmatowicz T., Mazurek A.P., Stan prawny, wymagania oraz sposoby postępowania w procesie rejestracji lub dopuszczania do stosowania materiałów medycznych, Materiały Seminarium: Zastosowanie Polimerów w nowoczesnych technikach medycznych, Ustroń, 8-10 października 1997r., str. 49-63;

- Ustawa z dnia 10 października 1991r. o produkcji i dopuszczaniu do obrotu materiałów medycznych (Dz.U. nr 105, poz.452);

 rozporządzenie MziOS z dnia 15 grudnia 1993r. o rejestracji środków farmaceutycznych i artykułów medycznych (Dz.U. nr 6);

- Ustawa o Ochronie Zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997r. Dz.U. nr 111, poz.724);

- Directive 86/609/EEC : protection of animals used for experimental and other scientific purposes (wersja angielska).

DIAMOND-COATED IMPLANTS FOR TRAUMATOLOGY

S. MITURA*, J. MARCINIAK **, P. NIEDZIELSKI*, Z. PASZENDA**

 \cdot Institute of Materials Science and Engineering, Technical University of Łódź, Łódź

 \cdot ** Institute of Engineering and Biomedical Materials, Technical University of Silesia, Gliwice

Abstract

A method of deposition of passive-diamond coatings onto implants made of Cr-Ni-Mo steels applied in traumatology has been developed. Structure of the layer as well as its physicochemical properties under stimulated experimental conditions, mainly with respect to its corrosion resistance, have been investigated. Moreover, biotolerance of improved implants in tissues of experimental animals and during clinical examinations has been evaluated. The new quality of implants guarantees good useful properties. The obtained results are promising for future clinical applications. **Słowa kluczowe**: chirurgia kostna, traumatologia, biomateriały metaliczne, warstwy diamentowe, własności fizykochemiczne biomateriałów metalicznych

Key words: osteopedic surgery, traumatology, metallic biomaterials, diamond layers, physicochemical properties of metallic biomaterials

Wprowadzenie

W chirurgii kostnej narządu ruchu i stomatologicznego stosowane są krótkotrwałe implanty metaliczne ze stali chromowo - niklowo - molibdenowych a także w mniejszej ilości z tytanu i jego stopów. Biomateriały metaliczne w traumatologii i chirurgii szczękowo - twarzowej przeznaczone są na implanty stosowane do osteosyntezy. Wytwarza się z nich różne postacie użytkowe implantów dostosowanych do określonych technik zespalania odłamów. Implanty muszą spełniać określone wymagania, które zapewniać powinny bezpieczne i niezawodne ich stosowanie zarówno w stadium przedoperacyjnym, podczas zabiegu, jak też w okresie usprawniania miejsca urazu. Zaostrzanie kryteriów jakościowych dla implantów zmierza do minimalizowania powikłań pooperacyjnych.

Istotnym kryterium jakości implantów jest ich biotolerancja, która wiąże się z podatnościa do iniciowania reakcji toksycznych, alergicznych i efektami drażnienia tkanek przez implant. Biotolerancja zależy ściśle od oporności korozyjnej biomateriału metalicznego. W wyniku korozji uwolnione jony metaliczne w otoczeniu implantu mogą inicjować utworzenie torebki łącznotkankowej z odczynami fagocytarnymi i pomnażaniem włókien kolagenowych. Dalej następuje ich szkliwienie, a także wbudowywanie sie jonów do otaczających tkanek i do krwi. Stwierdzono też możliwość przemieszczania się jonów metali do białek cytoplazmy hepatocytów i inicjowania zaburzeń w enzymach utleniających. Łączenie się jonów metali z proteinami sprzyja tworzeniu kompleksów immunogennych. W konsekwencji obserwowane są zmiany histopatologiczne w narządach miąższowych (śledzionie, watrobie, płucach i nerkach) [1.2]. Do obserwowanych w praktyce klinicznej powikłań pooperacyjnych zaliczyć można [2] :

 - nadwrażliwość immunologiczną organizmu (alergozy), która może przyczynić się do powstania martwicy kości lub tkanek miękkich,

 zakrzepy (przy potencjałach powierzchniowych implantu powyżej 300 mV),

 - spadek pH w pobliżu implantu w wyniku korozji, która przyczynia się do zmniejszenia tlenu w otaczających tkankach, a w konsekwencji zmniejszenia odporności komórek na bakterie,

 utworzenie gradientu potencjału elektrycznego na granicy metal - płyn ustrojowy, który z kolei osłabia aktywność neutrofilii i makrofagów, a co ułatwia także rozwój flory bakteryjnej.

Problematyka odporności korozyjnej stali Cr - Ni - Mo w chirurgii kostnej jest w literaturze dosyć często analizowana [3-7]. Stale te mają strukturę austenityczną z niewielką ilością węglików $M_{23}C_6$. Poprzez doskonalenie składu chemicznego i fazowego stali nie można uzyskać znaczącej poprawy odporności korozyjnej, a przez to zwiększenia biotolerancji. Aktualne prowadzone w wielu ośrodkach badania koncentrują się na poprawie własności fizykochemicznych powierzchni implantów ze stali Cr - Ni - Mo technikami wiązkowymi lub kierunkowymi, rozwijanymi w obszarze inżynierii powierzchni [8]. Bardzo korzystny wpływ na odporność korozyjną implantów z tej stali wywierają warstwy pasywne i pasywno - węglowe [9,10].

Implanty ze stali Cr - Ni - Mo ulegają korozji. Rodzaj korozji oraz intensywność jej przebiegu zależą od składu chemicznego i fazowego stali, rodzaju i wielkości obciążenia, cech geometrycznych implantu lub układu implantów, stanu powierzchni, stosowanej techniki operacyjnej i jakości Introduction

In osteopedic surgery of the organ of motion and in dental surgery, short-term metallic implants made of chromium - nickel - molybdenum steels, and also in a smaller quantity - of titanium and its alloys - are applied. Metallic biomaterials in traumatology and maxillofacial surgery are employed for the implants used in osteosynthesis. Different functional forms of implants adapted to specific methods of uniting fragments of fractured bones are made. The implants must satisfy requirements, which should ensure their safe and reliable application both in a preoperative stage, during the operation, as well as during rehabilitation of the trauma site. Higher quality requirements imposed on implants aim at minimisation of postoperative complications.

Biotolerance which is connected with susceptibility to initiate toxic, allergic reactions and with effects of tissue irritation by an implant is a crucial criterion as far the implant quality is concerned. Biotolerance is strictly dependent on the corrosion resistance of a metallic biomaterial. Metallic ions released in the vicinity of an implant as a result of corrosion can initiate the formation of a connective tissue capsule with phagocytic reactions and cause the multiplication of collagen fibres. Then, their hyalinisation takes place, and the ions begin to incorporate into the surrounding tissues and into blood. It has been also stated that metal ions may migrate to hepatocyte cytoplasm proteins and initiate distortions in oxidising enzymes. The fact that the metal ions combine with the proteins facilitates the generation of immune complexes. As a consequence, histopathological changes in parenchymatous organs (i.e. spleen, liver, lungs and kidneys) are found [1, 2]. Among postoperative complications observed in clinical practice, one can mention [2]: - immunological hypersensitivity of the organism (allergosis), which can result in osteonecrosis or necrosis of soft tissues,

- intravascular clots (at the implant surface potentials exceeding 300 mV),

- decrease in pH in the vicinity of an implant resulting from corrosion, which contributes to a decrease in the amount of oxygen in the surrounding tissues, and as a result, to a decrease in the immunity of tissues to bacteria,

- generation of an electric potential gradient at the boundary: metal - biological fluid, which, in turn, reduces the activity of neutrophiles and macrophages and which facilitates the development of bacterial flora.

Problems connected with the resistance to corrosion of Cr-Ni-Mo steels in osteopedic surgery are often analysed in the literature [3-7]. These steels are characterised by an austenitic structure with a small amount of $M_{23}C_6$ carbides. A significant increase in the corrosion resistance, and, thus, an increase in biotolerance cannot be achieved through an improvement of chemical and phase composition of steel. The investigations carried out now in numerous centres are focused on the improvement of physicochemical properties of the surface of Cr-Ni-Mo implants by means of plasma chemical and electron-beam methods, developed in the field of surface engineering [8]. Passive layers and passive-carbon layers exert a very advantageous effect on the resistance to corrosion of implants made of these steels [9,10].

Implants made of Cr-Ni-Mo steels are prone to corrosion. Type and intensity of the corrosion process depends on chemical and phase composition of steel, type and magnitude of loading, geometry of an implant or of a system of implants, surface characteristics, operative method applied przeprowadzonego zabiegu. Schematyczny podział niszczenia korozyjnego implantów przedstawia RYS. 1.

and quality of the operation. Schematic classification of the corrosive degradation of implants is given in FIG. 1.



FIG. 1. Schematic classification of metallic implant degradation.

Bez wstępnej analizy struktury chemicznej i fazowej, własności fizykochemicznych powierzchni implantu oraz oceny stanu jego naprężeń i odkształceń utrudniona jest ocena niszczenia korozyjnego implantu.

Proponując nową jakość implantów dla chirurgii rekonstrukcyjnej należy przeprowadzić szczegółowe ich badania zarówno w symulowanych warunkach laboratoryjnych, jak też w tkankach zwierząt doświadczalnych. Ostateczna kwalifikacja jakości i ich przydatności następuje podczas weryfikacji klinicznej dla uzasadnionej populacji pacjentów.

Materiał i metody

Wieloletnie badania autorów koncentrowały się na zwiększaniu odporności na korozję i biotolerancji implantów ze stali Cr-Ni-Mo, której przedstawicielem jest powszechnie stosowany gatunek AISI 316L, z którego wytwarzane są różne postaci użytkowe implantów dla traumatologii i chirurgii szczękowo-twarzowej. Do badań wytypowano stal o składzie chemicznym i fazowym oraz własnościach mechanicznych zgodnych z ustaleniami normy ISO [11]. Własności mechaniczne stali odpowiadały zalecanym dla najczęściej wytwarzanych implantów (wkrętów, płytek i gwoździ) i mieściły się w granicach: wytrzymałość na rozciąganie $R_m = 950 - 1100$ MPa, granica plastyczności $R_{0.2} = 850 - 880$ MPa i wydłużenie $A_5 = 17 - 14$ %.

Próbki do badań laboratoryjnych i oceny biotolerancji w tkankach zwierząt doświadczalnych przygotowano przez: - polerowanie mechaniczne,

- polerowanie mechaniczne i elektrolityczne,

- polerowanie mechaniczne i elektrolityczne oraz pasywację chemiczną,

- polerowanie mechaniczne i elektrolityczne, pasywację

Evaluation of the corrosive degradation of an implant is difficult without the initial analysis of its chemical and phase composition, physicochemical properties of its surface and without the evaluation of its stress-strain state.

The proposed new quality of implants for reconstruction surgery should be tested both under simulated laboratory conditions and in tissues of experimental animals. Final evaluation of their usefulness takes place during the clinical verification carried out on a selected population of patients.

Materials and methods

The research carried out by the authors for many years has been focused on the improvement of corrosion resistance and biotolerance of implants made of Cr-Ni-Mo steels, represented by the commonly used AISI 316L type, from which various functional implants for traumatology and maxillofacial surgery are produced. The steel selected for the tests is characterised by chemical and phase composition and mechanical properties satisfying the requirements imposed by the ISO standard [11]. The mechanical properties of the steel correspond to the recommendations for most often produced implants (screws, plates and nails) and fall within the following limits: tensile strength R_m = 950 - 1100 MPa, yield strength R_{0.2} = 850 - 880 MPa, and elongation $A_5 = 17 - 14 \%$.

The samples to be used in laboratory tests and biotolerance evaluation in tissues of experimental animals were prepared by means of:

- mechanical polishing,
- mechanical and electrolytic polishing,

- mechanical and electrolytic polishing, and chemical passivation,

chemiczną oraz naniesienie warstwy diamentowej metodą RF CVD.

Warunki polerowania i pasywacji oraz nanoszenia warstwy diamentowej opracowane zostały we wcześniejszych badaniach autorów i zastrzeżone patentem [12]. Zróżnicowanie stanów powierzchni stwarzało możliwości ustalenia roli jaką spełniają poszczególne składowe warstwy kompozytowej pasywno - diamentowej w odporności korozyjnej implantów i jej biotolerancji w środowisku tkankowym. W tym celu prowadzono szczegółowe badania struktury i własności fizyko - chemicznych, a mianowicie:

- analizę jakościową i ilościową struktury metalicznego podłoża z wykorzystaniem komputerowej analizy obrazu,

- analizę chemiczną warstwy pasywnej za pomocą spektroskopii elektronowej Auger'a,

- analizę fazową warstwy diamentowej, wykorzystując spektroskopię Ramana,

 - badania odporności na korozję wżerową próbek o zróżnicowanych stanach powierzchni metodą potencjodynamiczną w płynie fizjologicznym Tyrode'a w temperaturze 37±1°C
 i pH = 6,9-7,4 przy zmianach potencjału 2,5 mVs⁻¹ [9],

 badania odporności na korozję wżerową w płynie fizjologicznym Tyrode'a w temperaturze 37±1°C i pH = 6,9-7,4 po różnym odkształceniu implantów o zróżnicowanym stanie powierzchni. Uginano płytki kostne strzałką ugięcia 2,5 i 3,5 mm podpartej w odległości 26 mm, zgodnie z zaleceniami metody AO,

- badania odporności na korozję naprężeniową przy stałej szybkości odkształcania 1,44·10⁻⁴ mms⁻¹, badania prowadzono w roztworze gliceryny i 44% roztworze MgCl₂ w temperaturach 37°C i 154°C i w roztworze fizjologicznym Tyrode'a. Wyznaczono wskaźniki K_o i K_r, wyrażające odpowiednio stosunek maksymalnego naprężenia rozciągającego

 $\sigma_{\rm k\,max}$ w środowisku korozyjnym (MgCl₂, roztwór Tyrode'a) do maksymalnego naprężenia rozciągającego $\sigma_{0\,\rm max}$ w środowisku obojętnym oraz stosunek czasu do zerwania próbki w środowisku korozyjnym $\tau_{\rm k}$ i w środowisku obojętnym $\tau_{\rm o}$ [10],

- badania odporności na korozję naprężeniową przy stałym odkształceniu o wartości 0,8 R_{0,2} i R_{0,2} w okresie do 12 miesięcy w płynie fizjologicznym Tyrode'a w temperaturze $37\pm1^{\circ}$ C i pH = 6,8-7,4,

 badania fraktografii powierzchni implantów w stanie wyjściowym i po badaniach korozyjnych i po ocenie biotolerancji w tkankach,

- badania adhezji warstwy diamentowej do metalicznego podłoża metodą Scratch Test,

- pomiar grubości warstwy diamentu metodą Kalotest,

- badanie ścieralności warstwy diamentowej poprzez wkręcanie wkrętów do warstwy korowej kości.

Zrezygnowano z badania odporności na korozję zmęczeniową próbek, gdyż w warunkach chirurgii urazowej kwestia ta jest drugorzędna. Należy zaznaczyć, że w badaniach zmęczeniowych warstwy diamentowej na podłożu stopów na osnowie kobaltu w postaci endoprotezy stawu biodrowego typu Wellera, nie wykazano jej wypływu na obniżenie odporności korozyjnej [13].

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono warunki techniki wytwarzania powłok kompozytowych o optymalnych własnościach fizykochemicznych. W tych warunkach naniesiono warstwę kompozytową na implanty z badanej stali z losowo wybranego wytopu o składzie chemicznym, strukturze oraz własnościach mechanicznych zgodnych z wymaganiami normy ISO 5832 - 1. Implanty te w postaci krążków o średnicy 5,0 mm i grubości 1,0 mm, o masie 0,750±0,010g wszczepiano zwierzętom doświadczalnym (świnkom morskim). Celem tych badań była ocena biotolerancji implantów z warstwami pasywno - diamentowymi. Badania prowadzono na populacji zwierząt po 12 sztuk zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej. Zwierzę- mechanical and electrolytic polishing, chemical passivation, and deposition of a diamond coating by RF CVD method.

The conditions for polishing and passivation, as well as for diamond coating deposition were established by the authors earlier and protected by a patent [12]. Differentiation of the surface finish of the samples made it possible to determine the role played by individual components of the composite passive-diamond layer in the corrosion resistance of implants and the biotolerance of this layer in the tissue environment. Detailed examination of the structure and physicochemical properties comprised:

- qualitative and quantitative analysis of the metallic substrate structure using computer picture analysis,

- chemical analysis of the passive layer by means of Auger electron spectroscopy,

- phase analysis of the diamond layer with Raman spectroscopy,

- tests of the resistance to pitting corrosion of samples with different surface characteristics by means of the method of dynamic potential in the Tyrod physiological solution at the temperature $37\pm1^{\circ}$ C and pH = 6.9 -7.4, and changes in the potential 2.5 mVs⁻¹ [9],

- tests of the resistance to pitting corrosion in the Tyrod solution at the temperature $37\pm1^{\circ}$ C and pH = 6.9-7.4, after various deformations of implants with different surface parameters. The plates uniting fragmented bones were subjected to the deflection of 2.5 and 3.5 mm at the support distance of 26 mm, according to the recommendations imposed by the AO method,

- tests of the resistance to stress corrosion at the constant deformation velocity of 1.44·10⁻⁴ mms⁻¹. The tests were carried out in the glycerol solution and a 44% solution of MgCl₂ at the temperature of 37°C and 154°C and in the Tyrode fluid. The coefficients K_o and K_t denoting ratio of the maximum tensile stress, $\sigma_{k max}$, in the corrosive environment (MgCl₂, Tyrode solution) to the maximum tensile stress, $\sigma_{0 max}$, in the neutral environment and a ratio of the time to rapture of the sample in the corrosive environment, τ_k , and in the neural environment, τ_0 , were determined, respectively, - tests of the resistance to stress corrosion at the constant deformation of 0.8 R_{0.2} and R_{0.2} for a period up to 12 months in the Tyrode physiological solution at the temperature 37± 1°C and pH = 6.9-7.4,

 tests of implant surface fractography under initial conditions and after corrosive tests and evaluation of biotolerance in tissues,

tests of the diamond layer adhesion to the metallic substrate
 Scratch Test,

- measurement of the diamond layer thickness using the Kalotest method,

 tests of abrasion of the diamond layer by means of screwing the screws into the cortical layer of bones.

Tests of the resistance to fatigue corrosion of samples were neglected as this type of degradation is of minor importance in traumatic surgery. It should be noted that in the fatigue tests of the diamond layer, deposited on the substrate made of cobalt-based alloys in the form of the Weller-type endoprosthesis of the hip joint, its detrimental effect on the corrosion resistance was not observed [13].

On the basis of these tests it became possible to establish the conditions of preparation of the composite coatings with optimal physicochemical properties. Thus, the composite layer was deposited on implants made of a casting of the investigated steel. Its chemical composition, structure and mechanical properties were in compliance with the requirements given in the ISO 5832-1 standard. Implants in the form of disks, 5.0 mm in diameter and 1.0 mm thick, mass of 0.750±0.010 g, were placed in experimental animals (guinea pigs). The aim of these tests was to evaluate

ta pochodziły z hodowli Centralnej Zwierzętarni Śląskiej Akademii Medycznej. Ogólnie procedura badań odpowiadała zaleceniom Komitetu Medycznego ASTM [14]. Ocenę biotolerancji prowadzono na podstawie:

obserwacji zwierząt,

- badań radiologicznych,

badań histopatologicznych tkanek podskórnych, mięśni i kości,

 badań uszkodzeń korozyjnych powierzchni implantów przed i po eksperymencie, po 12, 26 i 52 tygodniach obserwacji. Po tych okresach zbadano także tkanki narządów wewnętrznych wątroby, nerek, śledziony i płuc.

Pozytywne wyniki badań dały podstawę do badań biotolerancji w 4 ośrodkach klinicznych dla populacji 4 do 8 pacjentów. Badania te przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Śląskiej Akademii Medycznej.

Badania zrealizowano z wykorzystaniem różnych opcji systemu stabilizacyjno - manipulacyjnego POLFIX. W poszczególnych stabilizatorach tylko wkręty korowe i dogąbczaste były pokryte warstwą pasywno - diamentową o optymalnych własnościach fizykochemicznych. Powierzchnie wkrętów użytych do badań klinicznych poddano ocenie fraktograficznej w mikroskopie świetlnym i skaningowym zarówno przed, jak i po usunięciu z tkanek.

Wyniki badań

Obszerne, wieloletnie i kompleksowe badania stanowią podstawę do sformułowania uogólnień istotnych dla praktyki klinicznej w kwestii przydatności implantów ze stali Cr-Ni-Mo uszlachetnionych powłokami pasywno - diamentowymi.

Ogólnie należy stwierdzić, że do wyrobu różnych postaci użytkowych implantów ze stali Cr-Ni-Mo należy stosować tylko wytopy o strukturze i własnościach spełniających zalecania norm przedmiotowych ISO i jej odpowiedników. Istotną kwestią jest skład chemiczny oraz dodatkowe kryterium warunkujące odporność stali na korozję wżerową (%Cr + 3,3% Mo ≥ 26). Dużą rolę w odporności na korozję odgrywa poziom zanieczyszczeń stali wtrąceniami niemetalicznymi zastrzeżony w normie. Obecność zbyt dużej ilości wtrąceń, szczególnie o dużych wymiarach utrudnia uzyskanie dobrej jakości powierzchni. Wtrącenia te w końcowej operacji polerowania elektrolitycznego ulegają ekstrakcji, pozostawiając ubytki powierzchniowe, ułatwiające inicjowanie wżerów korozyjnych, pogarszających biotolerancję. Drobnoziarnistość struktury (min. nr wzorca 4) jest szczególnie korzystna dla cienkich implantów poddawanych modelowaniu przedoperacyjnemu lub dużym obciążeniom. Stale Cr-Ni-Mo mają strukturę austenityczną, w której często obserwuje się obecność węglików M₂₃C₆. Duża ich ilość, a szczególnie wydzielenia na granicach ziaren austenitu, przyczynia się do obniżenia odporności na korozję. Stąd też zabiegi obróbki cieplnej stali nie powinny być prowadzone w zakresie temperatur, w którym ułatwiony jest proces ich wydzielania [7].

Ocena ilości fazy ferromagnetycznej - ferrytu δ metalografią ilościową jest mało czułą metodą dla skontrolowania własności magnetycznych stali. Jak wiadomo, z uwagi na magnetotropizm niektórych tkanek czy składników krwi [2, 7] problem ten powinien być w perspektywie bardziej zdeterminowany, a więc ustalone powinny być inne kryteria jakościowe dla oceny ferromagnetyzmu biomateriału metalicznego.

Implanty ze stali Cr-Ni-Mo w stanie szlifowanym czy polerowanym mechanicznie mają małe potencjały przebicia ok. (400-420 mV). Implanty muszą być polerowane bowiem ograniczona została normami maksymalna chropowatość (Ra \leq 0,16 μ m). Można ją osiągnąć przez stosowanie szlifowania, polerowania mechanicznego i elektrolitycznego. biotolerance of implants with passive-diamond layers. The tests were carried out in the population of 12 animals, both in the control and experimental group. The animals were bred at the Central Experimental Animal Farm of the Silesian Medical Academy. The general test procedure complied with the recommendations provided by the ASTM Medical Committee [14]. The evaluation of biotolerance was based on: - observation of animals.

- x-ray examinations.

- histopathological examination of subcutaneous, muscular and osseous tissues,

- investigations of corrosive degradation of the implant surface before and after the experiment, i.e. after 12, 26 and 52 weeks of observation. After these periods the tissues of inner organs, i.e. liver, kidneys, spleen and lungs, were examined as well.

The positive results of the tests were the basis for the investigations of biotolerance in 4 clinical centres on the population of 4 up to 8 patients. The examinations were carried out with approval of the Bioethic Commission of the Silsian Medical Academy.

Different options of the universal plate fixation system POLFIX were employed during the investigations. In the stabilisers only cortical and spongy screws were coated with the passive diamond layer having optimal physicochemical properties. The surface of the screws used in clinical experiments was subjected to the fractographic evaluation by optical and scanning electron microscopy, both before and after their removal from tissues.

Results

The extensive and complex investigations continued for many years allowed for the formulation of general statements, crucial for clinical practice as far as the usefulness of implants made of Cr-Ni-Mo steels and coated with passive-diamond layers is concerned.

In general, it can be stated that to produce different functional forms of implants made of Cr-Ni-Mo steels only castings with the structure and properties corresponding to the respective ISO standards and equivalent standards should be used. An important issue is that of chemical composition and the resistance of steel to pitting corrosion (%Cr +3.3% Mo ≥ 26). A significant role in the corrosion resistance is played by impurities in the form of non-metallic inclusions which concentration is stipulated in the standard. The presence of too many inclusions, especially those with big dimensions, makes it difficult to obtain good quality of the surface. During final electrolytic polishing these inclusions are extracted, leaving behind surface defects which facilitate the formation of corrosion pits and decrease biotolerance.

Fine-grained structure (min. pattern No. 4) is especially advantageous for thin implants that are shaped preoperatively or heavily loaded.

The Cr-Ni-Mo steels exhibit an austenitic structure in which $M_{23}C_6$ carbides are often observed. Their large amount, especially in the grain boundary region, contributes to decreased corrosion resistance. Hence, heat treatment of steels should not be conducted in the range of temperatures in which carbide precipitation is facilitated [7].

Evaluation of the quantity of the ferromagnetic phase, δ -ferrite, by means of quantitative metallography is a low-sensitivity method to control magnetic properties of steel. As it is known, some tissues or blood components exhibit magnetotropism [2, 7], and therefore in future other qualitative criteria should be established for the evaluation of ferromagnetism of metallic biomaterials.

Implants made of Cr-Ni-Mo steels in the ground or mechanically polished state exhibit low breakdown potentials -

Tradycyjnie stosowana technologia polerowania prowadzona jest w elektrolicie na bazie H₃PO₄ i CrO₃ z następną pasywacją chemiczną w roztworze HNO₃. Dla tych warunków uzyskuje się potencjały przebicia w zakresie 550-600 mV [15]. Autorzy opracowali nowy rodzaj elektrolitu i warunków polerowania elektrolitycznego oraz pasywacji chemicznej [12], który pozwala ze stanu szlifowanego z pominięciem polerowania mechanicznego, uzyskać wymienioną chropowatość, a równocześnie zapewnić potencjały przebicia w zakresie 950-980 mV, z gęstością prądu w zakresie pasywnym nie przekraczającą 0,02 A/cm² [10,16]. Nowa technika obróbki końcowej implantów gwarantuje im wyższą jakość pod względem odporności na korozję wżerową.

Spektroskopia Augera wykazała, że w warstwie pasywnej o grubości 1,5-3 nm przez zabieg polerowania elektrolitycznego nastąpił wzrost stężenia chromu o ok. 4,8% i molibdenu ok. 2,3% w odniesieniu do stężenia tych pierwiastków w podłożu [16].

Odkształcenie płytek do stabilizacji złamań metodą AO, a więc przez zastosowanie zalecanej strzałki ugięcia do 3,5 mm, nie niszczy warstwy pasywnej. Potencjały przebicia mieszczą się jeszcze w zakresie 525-725 mV [16]. Implanty z wymienioną warstwą pasywną są odporne także na korozję naprężeniową w roztworze fizjologicznym Tyrode'a [10,16].

Kolejna warstwa diamentowa naniesiona została na pasywną metodą RF PCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Vapour Deposition) [17, 18, 19]. Grubość warstwy wynosiła 300 do 500 nm. Warstwa ta zbudowana jest z bardzo drobnych kryształów o wielkości kilkudziesięciu nm - RYS.2.

Warstwa zawierała ok. 96% fazy diamentowej. Resztę stanowiły drobnokrystaliczny grafit oraz karbiny [17, 18]. Warstwę tę cechowała dobra adhezja do metalicznego podłoża (siła krytyczna potrzebna do zerwania sił wiązania Fe_{Sr} -

approx. 400-420 mV. The implants are polished as their maximum roughness is specified by respective standards (Ra $\leq 0.16 \,\mu$ m). This roughness can be achieved through grinding, mechanical and electrolytic polishing. The traditional polishing process is performed in an electrolyte based on H₃PO₄ and CrO₃ and it is followed by chemical passivation in a solution of HNO₃. Under such conditions, breakdown potentials of 550-600 mV are obtained [15]. The authors have developed a new type of electrolyte and conditions for electrolytic polishing and chemical passivation [12], which allow to achieve the above-mentioned roughness by means of grinding without mechanical polishing, and ensure breakdown potentials in the range of 950-980 mV, with the current density in the passive range not exceeding 0.02 A/cm² [10, 16]. A new technique for the surface finish of implants guarantees higher quality in terms of pitting-corrosion resistance.

Auger spectroscopy showed that as a result of electrolytic polishing, the concentration of chromium and molybdenum in the passive layer, 1.5-3 nm thick, increased by approx. 4.8% and 2.3%, respectively, in comparison with the bulk material [16].

Deformation of plates for fracture stabilisation with the AO method, i.e. through an application of the recommended deflection up to 3.5 mm, does not destroy the passive layer. The breakdown potentials remain in the range 525-725 mV [16]. Implants with the above-mentioned passive layer are also resistant to stress corrosion in the Tyrode physiological solution [10,16].

The next diamond layer was deposited onto the passive one by means of the RF PCVD (Radio Frequency Plasma Chemical Deposition) method [17, 18, 19]. Thickness of this layer was 300 to 500 nm. This layer consisted of very fine crystals, which size was several tens of nm - FIG. 2.



MATERIALOW

68,4 N). Naniesienie tej warstwy podwyższa potencjały przebicia do wartości 1100-1130 mV, a gęstość prądu w zakresie pasywnym nie przekraczała 0,008 mA/cm² [16,19]. Jest to więc prawie 3-krotny wzrost odporności na korozję wżerową implantu - RYS.3. Przeprowadzone badania wykazały, że wytworzona w zastosowanych warunkach warstwa pasywna wzbogacona w chrom i molibden, a także dodatkowa warstwa węglowa skutecznie blokują procesy korozyjne nawet nie pasywujących się obszarów implantów, jakim są wtrącenia niemetaliczne i węgliki, które zazwyczaj stanowią uprzywilejowane miejsca inicjacji wżerów. Implanty pokryte wymienionymi warstwami są ponadto odporne na

The layer included approx. 96% of the diamond phase. The remaining part was built of fine-crystalline graphite and carbenes [17, 18]. The layer was characterised by good adhesion to the metallic substrate (critical load needed to break the bonding forces, Fe_{sr} , was 68.4 N).

The deposited layer increased the breakdown potentials up to 1100-1130 mV, whereas the current density in the passive range did not exceed 0.008 mA/cm²[16, 19]. Hence, the resistance to pitting corrosion of the implant has increased almost three times - FIG. 3. The results of tests indicate that the passive layer, enriched in chromium and molybdenum, as well as the additional carbon layer



RYS .3. Krzywe polaryzacji anodowej implantów ze stali AISI 316 w roztworze Tyrode'a: 1-powierzchnia szlifowana, 2-powierzchnia polerowana elektrolitycznie i spasywowana, 3-powierzchnia polerowana elektrolitycznie, spasywowana i pokryta warstwą diamentu

FIG. 3. Curves showing the anodic polarisation of the AISI 316 steel implants in the Tyrode solution: 1-ground surface, 2-electrolytically polished and passivated surface, 3-electrolytically polished and passivated surface, coated with a diamond layer.

korozję naprężeniową w roztworze Tyrode'a.

Kompozytowa warstwa nie ulega zniszczeniu podczas odkształcenia przedoperacyjnego stosowanego w osteosyntezie AO [16]. Twardość warstwy nanokrystalicznego diamentu wynosiła 94 GPa [17, 18, 19]. W próbach ścieralności warstwy naniesionej na wkręty kostne poprzez 100-krotne wkręcanie do kości korowej nie wykazały jej uszkodzeń. Szczegółowe własności warstwy diamentu przedstawia TABELA 1.

Na podstawie badań z wykorzystaniem metod przydatnych do kwalifikacji biomateriałów metalicznych można uznać, że jakość warstwy jest bardzo dobra.

Dodatkowych informacji dostarczyły badania biologiczne, a więc ocena biotolerancji implantów z wymienioną warstwą w tkankach zwierząt doświadczalnych i w zastosowaniach klinicznych.

W badaniach histopatologicznych zwierząt proces gojenia w tkance podskórnej, kostnej i mięśniach zakończył się wytworzeniem wokół wszczepów torebki łącznotkankowej, zbudowanej z fibrocytów i włókien kolagenowych. W ścianach torebek nie obserwowano odczynu fagocytarnego, ani produktów korozji. Narządy wewnętrzne także nie wykazywały żadnych zmian. Całość obrazu patomorfologicznego wskazywała na bardzo dobrą biotolerancję wszczepionych biomateriałów metalicznych z zastosowanymi powłokami, a także ich odporność na korozję w środowisku tkanek i płynów ustrojowych.

W badaniach klinicznych stwierdzono całkowity brak odczynów okołowszczepowych wokół wkrętów i brak reakcji tkanek na wszczep, nie obserwowano infekcji. Stwierdzono też zmniejszoną aktywność układu krzepnięcia oraz brak lizy kości wokół wszczepu. W badaniach na mikroskopie skaningowym na powierzchni wkrętów po ich usunięciu nie efficiently block the corrosive processes even in those regions of implants, which do not undergo passivation, i.e. non-metallic inclusions and carbides which are usually favourable places for the initiation of pitting. Moreover, implants covered with the above-mentioned layers are resistant to stress corrosion in the Tyrode solution.

The composite layer is not prone to degradation during the preoperative deformation used in the AO osteosynthesis [16]. Hardness of the nanocrystalline diamond layer was equal to 94 GPa [17,18,19]. After the abrasive tests, consisting in 100 screwings into the cortical bone, the layer deposited onto bone screw did not show any damages. The properties of the diamond layer are given in TABLE 1.

The results of tests carried out to evaluate the usefulness of metallic biomaterials indicate that the quality of the investigated coatings is very good.

Additional data were received from the biological tests, i.e. evaluation of biotolerance of implants with the coating in tissues of experimental animals and in clinical applications.

According to histopathological examinations of animals, the healing process in subcutaneous, osseous tissues and in muscles finished by formation of a connective tissue capsule around the implants. This capsule was composed of fibrocytes and collagen fibres. Neither the phagocytic reaction nor products of corrosion were found in the walls of these capsules. There were no lesions in the inner organs, either. Total pathomorphological picture showed very good biotolerance of the implanted metallic biomaterials with coatings, as well as their resistance to corrosion in the environment of tissues and body fluids.

In the clinical examinations, neither foreign-body reactions around the implanted screws nor the tissue reactions ujawniono ubytków korozyjnych.

72

Ogólnie przeprowadzone kompleksowe i interdyscyplinarne badania z wykorzystaniem metod przydatnych do kwalifikacji jakości biomateriałów metalicznych wykazały, że implanty, z warstwami pasywno-diamentowymi mają to the implant nor the infections were observed. It was also stated that the activity of the clotting system was reduced and that there was no bone lysis around the implant. No corrosion damages on the surface of screws after their removal were found with scanning electron microscope.

Rodzaj własności Property	Charakterystyka Characteristics					
Struktura / Structure	Nanokrystaliczny diament / Nanocrystalline diamond (σsp ³), karbiny / carbines (sp ¹), drobnokrystaliczny grafit / fine-grained graphite (σsp ²)					
Adhezja / Adhesion	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,					
CSEM REVETEST ZWICK 3212	Fe _{sr} – 68,4 N Fe _{sr} – 64,3 N					
Czas wytwarzania warstwy o określonej grubości metodą RF CVD Time of deposition by RF CVD method to receive given coating thickness	3 min – 0,2 μm. 10 min – 0,7 μm.					
Nanotwardość / Nanohardness (Fischerscope HP 100)	≥94 GPa					
Odporność na korozję wżerową Resistance to pitting corrosion	Potencjał korozyjny / Corrosive potential $E_{kor} = 125 \text{ mV}$ Potencjał przebicia / Breakdown potential $E_{p.} = 1130 \text{ mV}$ Potencjał repasywacji / Repassivation potential $E_r = 960 \text{ mV}$ Gęstość prądu w zakresie pasywnym / Current density in the passive range $i_p = 0.008 \text{ mA/cm}^2$					
Biotolerancja w tkankach zwierząt (mięsień, kość, podskórna) Biotolerance in animal tissues (muscular, osseous, subcutaneous)	Bardzo dobra Very good					
Biotolerancja w warunkach klinicznych Biotolerance under clinical conditions	Bardzo dobra, bezodczynowe wgojenie Very good, reaction-free healing					

TABELA 1. Własności warstwy diamentowej [19].

TABLE 1. Properties of the diamond coating [19].

Piśmiennictwo

[1]. Ungenthňn M. Winkler-Gniewek W.: Toxyhologie der Metalle und, Biokompatibilitat Metallischer Implantwerhstoffe. Z. Orthop., 122, (1984), 99-105.

[2]. Marciniak J.: Perspectives of employing of the metallic biomaterials in the reconstruction surgery. Inżynieria biomateriałów 1, (1977), 12-19.

[3]. Mears D.C.: Metals in medicine and surgery; Review 218, International Metals Reviews Jane (1977), 119-155.

[4]. Kruger J.: Corrosion and degradation of implant materials. ASTM S. T. P. 648. Baltimore 107, 1979.

[5]. Zitter H., Schasch-Outschar D.: Schadensffulle an chirurgischen Implantaten und deren Ursachen. Wekst. Korros. 32, (1981), 324-331.

[6]. Zitter H.: Schadensffulle an chirurgischen Implantaten und ihre Ursachen. Werkst. Korros. 42, (1991), 455-466.

[7]. Marciniak J.: Biomateriały w chirurgii kostnej. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice 1992.

[8]. Burakowski T., Wierzchoń T.: Inżynieria powierzchni metali. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1995.

[9]. Marciniak J., Paszenda Z., Boba J., Rola warstwy pasywnej i diamentopodobnej w odporności korozyjnej implantów ze stali AISI 316L. XIII Konf. Metaloznawcza, Komitet Metalurgii PAN, Warszawa (1992), 77-78.

References

[10]. Marciniak J., Boba J., Paszenda Z., Mitura S.: Einflub von Passievierungs - und Kochlenstoffschichten auf die Bestandigkeit gegen Lochfrab und Spannungsribkorrosion Werkst. Korros. 44, (1993), 379-383.

[11]. Norma ISO 5832-1:1987 (E).

[12]. Patent RP nr P 314703.

[13]. Paszenda Z., Marciniak J.: The influence of the base structure and carbon coating on the corrosion resistance of the Co-Cr- Mo alloy. J.Mater. Proc.Techn.78, 1-3, (1998), 143-149.

[14]. Norma ASTM F 981-86.

[15]. Marciniak J.: Stabilizatory do zespoleń dociskowych kości. Projekt badawczy KBN nr 417389101. Gliwice 1994.
[16]. Boba J.: Wpływ wytypowanych powłok ochronnych na odporność korozyjną implantów ze stali 00H17N14M2A. Praca doktorska Pol. Śląskiej, Gliwice 1992.

[17]. Mitura S., Niedzielski P., Sokołowska A., Mitura A.: "Warstwy nanokrystalicznego diamentu dla potrzeb medycyny", Bull. UJ, Uniwersytet Jagieloński, Kraków, (1998), 210-221.

[18]. Mitura S., Mitura A., Niedzielski P., Couvrat P.: "Nanocrystalline Diamond", w: NANOMATERIALS, Pergamon Press, Elsevier, 1999,. 1-15.

[19]. Niedzielski P.: Wytwarzanie warstw nanokrystalicznego diamentu na potrzeby medycyny. Praca doktorska Pol. Łódzkiej, Łódź 1988.
Wskazówki dla Autorów

Prace do opublikowania w czasopiśmie "Inżynieria Biomateriałów" będą przyjmowane wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski.

Prosimy je nadsyłać na dyskietkach wyłącznie w formacie Word 6.x (lub wyższy) wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

Możliwe jest również dołączanie ilustracji w różnych formatach grafki typu .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Rozmiar artykułu:

- przeglądowego i pracy oryginalnej do 10 stron standardowego maszynopisu,
- komunikatu do 5 stron,
- noty technicznej do 3 stron
 Obowiązuje układ jednostek SI.
 Rysunki i tabele powinny być kolejno numerowane, a

ich opisy i treść podane w wersji dwujęzycznej.

- Struktura artykułu:
- streszczenie (do 200 słów),
- słowa kluczowe (3-10 słów),
- wprowadzenie,
- · materiał i metodyka,
- wyniki,
- dyskusja,
- wnioski,
- piśmiennictwo (wg systemu Harvard).

Odnośniki literaturowe w tekście należy podawać jako kolejne liczby arabskie w nawiasach kwadratowych.

Pismiennictwo (zawierające nazwiska autorów i skróty ich imion, tytuł artykułu, tytuł czasopisma, tom, rok w nawiasach okrągłych i strony) powinno być zamieszczone na końcu artykułu. Skrótów tytułów czasopism należy unikać bądź podawać zgodnie z Chemical Abstract. Cytując książki należy podawać numery odpowiednich rozdziałów.

Nie przewiduje się wypłacania honorariów autorskich.

Prace należy nadyłać na adres:

Redakcja "Inżynieria Biomateriałów" Akademia Górniczo - Hutnicza Katedra Ceramiki Specjalnej 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 fax. (48-12) 633-46-30 tel. (48-12) 617-24-62 e-mail: blazew@uci.agh.edu.pl apowroz@uci.agh.edu.pl

Instructions to authors

Contributions in English language version should be submitted to:

Editorial Office

"Engineering of Biomaterials"
University of Mining and Metallurgy,
Special Ceramics Department,
Al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków, Poland
fax. (48-12) 633-46-30, tel. (48-12) 617-24-62,
e-mail: blazew@uci.agh.edu.pl apowroz@uci.agh.edu.pl

Texts should be delivered on a 3.5-inch diskette, accompanied by a printout (with a double spacing) including drawings, photographs, tables etc. Recommended is IBM-compatible MS format, e.g. Word 6.x (or higher). Illustrations can be enclosed on diskettes in the formats: .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Advised paper length is:

- review papers and accounts of original unpublished research - up to 10 pages (standard manuscript pages);
- short communications up to 5 pages;
- technical notes up to 3 pages.

SI units should be used in the text.

Figures, Tables and Equations should be numbered in corresponding consecutive series of the Arabic numbers.

Layout of the paper should be the following:

- Abstract (up to 200 words)
- Key words (3-10 words)
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References

References should be made in the text by using consecutive Arabic numbers in brackets. Full references (including author's surname and abbreviated names, title of the paper, title of the journal, volume, year in parenthesis and pages) should be given in a list at the end of the paper. Abbreviations of journal titles should be avoided or used in accordance with those listed in Chemical Abstracts. Whenever a book is cited, the number of the relevant chapter should be given.

The journal makes no page charges.

MATERIALOW

BI MATERIAŁÓW

Warunki prenumeraty

Wydawnictwo Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie przyjmuje zamówienia na prenumeratę, która może obejmować dowolny okres, w którym wydawane są kolejne zeszyty. Zamawiający otrzyma zaprenumerowane zeszyty począwszy od daty dokonania wpłaty. Zamówienia wstecz będą realizowane w miarę posiadanych zapasów.

Realizacja zamówienia

Warunkiem realizacji zamówienia jest otrzymanie z banku potwierdzenia dokonania wpłaty przez prenumeratora.

Konto

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al.Mickiewicza 30/A-3 Bank Śląski S.A. O/Kraków, nr rachunku 10501445-1200856001

Należy podać swój adres, tytuł czasopisma, okres prenumeraty i liczbę zamawianych egzemplarzy.

Opłata

roczna - 48.- zł półroczna - 24.- zł

Subscription terms

Subscription orders should be addressed to the Polish Society for Biomaterials in Kraków.

The ordered issues will be delivered consecutively starting from the date of payment, acknowledged by the bank.

Earlier issues will be supplied if available.

Subscription rates:

12 months - 48,0 zl 6 months - 24,0 zl

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials, Al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków, Poland Bank Śląski S.A. O/Kraków, account no. 10501445-1200856001

It is requested to quote the subscriber's name, title of the journal, desired subscription period and number of the ordered copies.

PROTEIN ADSORPTION, CELL ADHESION AND POLYMER SURFACES: MOLECULAR PROCESSES AND EXPERIMENTAL METHODS P.G. Rouxhet, J.L. Dewez, Th. Marchal, Ch. Dupont-Gillain, Y. Dufrene Unité de Chimie des interfaces, Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

Abstract

Adsorption of extracellular matrix (ECM) proteins in competition with other substances is a key to explain the relationship between substratum surface hydrophobicity and mammalian cell adhesion: when polystyrene substrata were exposed simultaneously to ECM protein and a PEO-PPO-PEO polymer surfactant (Pluronic F68), either by pre-conditioning or through protein cell secretion, a weaker substratum hydrophobicity favoured adsorption of the protein and subsequent cell adhesion. This knowledge was used to achieve a selective adhesion of different types of mammalian cells on tracks (a few tens of mm wide) produced on polystyrene by photolithography and oxygen plasma treatment, conditioning the substratum with a solution of ECM protein and Pluronic F68.

Examination of a broader range of substrata confirmed that inhibition of cell adhesion on hydrophobic substrata is due to adsorption of substances competing with extracellular matrix proteins. However it also showed that substratum surface properties more subtle than overall wettability are important.

In situ observation of the nanoscale organisation of collagen adsorbed in the absence of competitor, using atomic force microscopy (AFM), showed that a smooth substratum surface allows collagen mobility and aggregation of molecular ends in the adsorbed phase. The organisation obtained after drying (smooth film, pattern) was examined by combining AFM, XPS and radiolabelling and found to be influenced by substratum roughness, substratum hydrophobicity and drying rate.

Key words: protein adsorption, cell adhesion, polymers, surface patterns, atomic force microscopy (AFM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), radiolabelling, nanotechnology. [Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 4-7]

BONE PLATES AND THEIR INFLUENCE ON MECHANICAL PROPERTIES Karel Balík*, Miroslav Sochor**, Josef Křena***, Bohuslav Cabrnoch**, Petr Glogar*, Iloslav Vilímek**, Vlasta Pešáková****

*Institute of Rock Structure and Mechanics ASCR, Prague, Czech Republic

**Czech Technical University, Prague, Czech Republic

***Composite, Letov-ATG, s.r.o., Prague, Czech Republic

Abstract

Carbon-carbon composite plates with three different reinforcement styles were manufactured and tested for mechanical properties and biocompatibility in view of their application as implants in bone surgery. Their stress state under load on bending was simulated by the Finite Element Method. The shape of the plates was designed to match the pig femur. The reinforcement was made of plain-weave carbon fabric lamina by stacking, coiling, or combination of both. Phenolic resin was used both as a precursor of the matrix and an impregnant. After final heat treatment at 2200°C a layer of pyrolytic carbon was deposited to reduce the formation of carbon particles. The plates with combined reinforcement yielded higher bending strength and lower stiffness on bending than those of human bones. Biocompatibility of the material was tested using "in vitro" and "in vivo" tests. The FEM stress distribution simulation yielded a good agreement of the failure location and bending strength value with the experimental data.

Key words: Carbon/carbon composite, bone fixation plates, reinforcement design, biocompatibility, strength and stiffness, modelling of mechanical properties

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 8-10]

ENKAPSULACJA KOMÓREK W CELU OTRZYMANIA HYBRYDOWYCH SZTUCZNYCH NARZĄDÓW

M. Kozicki*, P. Kujawa*, L. Pajewski**, M. Kołodziejczyk***, J. Narębski***, J. M. Rosiak*

* Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej w Łodzi

** Uniwersytet L'Aquila w L'Aquila, Włochy

*** Instytut Chirurgii Endokrynologii Akademii Medycznej w Łodzi Streszczenie

Komórki, zabezpieczone przed atakiem ze strony układu odpornościowego biorcy poprzez umieszczenie wewnątrz kapsuł polimerowych, stanowią obiecujący materiał w dziedzinie badań nad poszukiwaniem optymalnych układów, zdolnych do zastępowania uszkodzonych narządów. W artykule opisano dwie metody enkapsulacji komórek z użyciem alginianu sodu, usieciowanego jonami wapnia, jako wewnętrznej matrycy, w której znajdują się komórki. Stwierdzono, że dodatkowe otoczenie takiej kapsuły poli(alkoholem winylowym), usieciowanym za pomocą aldehydu glutarowego, powodowało denaturację białek komórki. Zastąpienie tej otoczki błoną z polimeru hydrofobowego, wytwarzaną metodą wytrącania międzyfazowego, zwiększało przeżywalność komórek. Dobierając odpowiednio warunki procesu uzyskano membrany przez które przenikały związki niskocząsteczkowe (np. składniki odżywcze) i białka o małej masie cząsteczkowej. Otoczki te były natomiast nieprzenikalne dla dużych białek układu odpornościowego. Metoda ta stanowi obiecujący sposób enkapsulacji komórek, które nie byłby uszkadzane i charakteryzowałyby się długoterminową przeżywalnością po implantacji.

Słowa kluczowe: hybrydowe sztuczne organy, enkapsulacja, immobilizacja, alginian sodu, żele jonowe, sieciowanie

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 11-15]

ENCAPSULATION OF LIVING CELLS TOWARDS ARTIFICIAL, HYBRID ORGANS M. Kozicki*, P. Kujawa*, L. Pajewski**, M. Kołodziejczyk***, J. Narębski***, J. M. Rosiak*

* Institute of Applied Radiation Chemistry, Technical University of Łódź

** University L'Aquila, L'Aquila, Italy,

*** Institute of Endocrinal Surgery, Medical Academy in Łódź Abstract

Living cells, protected from host immune system response in a manner of encapsulation inside polymer matrices, can provide surrogate device for maintaining or replacement of broken-down organs. In this paper two methods of living cells encapsulation are described. These methods are based on sodium alginate cross-linking induced by calcium cations. First attempt is based on an additional covering of alginate matrix by poly(vinyl alcohol) layer cross-linked with glutaraldehyde. However, this procedure caused denaturation of cellular proteins. Cells survived the process of encapsulation when the outer layer of the capsules was replaced by hydrophobic polymer membrane. This cover was produced using interfacial precipitation method. By selecting the appropriate conditions of encapsulation, the membranes permeable for low-molecular weight compounds (nutrients) and low-molecular weight proteins were developed. However, the high-molecular weight immune system proteins (g-globulin) could not diffuse through the formed layer. Described method could be a convenient tool for the encapsulation of living cells which are not damaged and are characterised by long-term survival.

Keywords: hybrid artificial organs, encapsulation, immobilisation, sodium alginate, ionic gels, cross-linking

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 11-15]

TRYBOLOGICZNE ZUŻYCIE POLIETYLENU UHMWPER

Schulte*, B.Cleff*, A. Pawelec**, J. Otfinowski***, B.Frańczuk***, M. Lekka****, J. Lekki****, Z. Stachura****

* Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany

** Klinika Ortopedii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

*** Klinika Traumatologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

**** Instytut Fizyki Jądrowej w Krakowie

Streszczenie

Polietylen o bardzo wysokiej masie cząsteczkowej UHMWPE / Chirulen DIN 58834 / był poddany badaniom na zużycie trybologiczne w urządzeniach typu pin-on-disc i ring-on-disc w powietrzu oraz w środowisku ciekłym. Uzyskane cząsteczki polietylenu będące produktami zużycia miały przeważnie zaokrąglone kształty, a ich wymiary nie przekraczały 500 mm. W tym samym przedziale wielkości zawierały się też rozmiary cząstek o kształtach nieregularnych. Topografia śladów zużycia oraz szorstkości powierzchni były badane przy użyciu skaningowego mikroskopu sił (SFM). Wyniki badań zostały porównane z danymi otrzymanymi na podstawie analizy cząsteczek UHMWPE znalezionych w tkankach pobranych podczas operacyjnej wymiany endoprotez stawu biodrowego.

Słowa kluczowe: polietylen UHMWPE, produkty zużycia, trybologia

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 16-20]

UHMWPE WEAR BY TRIBOLOGICAL LOAD

R. Schulte*, B.Cleff*, A. Pawelec**, J. Otfinowski***, B.Frańczuk***,

M. Lekka****, J. Lekki****, Z. Stachura****

* Institute of Nuclear Physics, Münster, Germany

** Department of Orthopaedics Collegium Medicum Jagiellonian University in Cracow *** Department of Traumatology Collegium Medicum Jagiellonian University in Cracow

**** Instytute of Nuclear Physics in Cracow

Abstract

Ultra high molecular weight polyethylene (UHMWPE) was tribologically loaded in a pin-ondisk and in a ring-on-disk tribo-tester under dry and wet conditions. PE wear particles were found to be mainly round with dimensions up to 500 mm. Length and thickness of irregularily shaped debris were within this range of dimensions, too. Wear trace topography and roughness were analyzed by means of a scanning force microscope (SFM). The results are compared with the appearence of UHMWPE debris in tissues resected on revision surgery of the total hip replacement.

Key words: polyethylen UHMWPE, wear debris, tribology. [Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 16-20]

OCENA WPŁYWU ELEKTROSTYMULACJI ZROSTU KOSTNEGO NA PROCES KOROZJI IMPLANTÓW ZE STALI Cr-Ni-Mo

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

Zakład Inżynierii Materiałów Biomedycznych Politechniki Śląskiej w Gliwicach Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad wpływem różnych metod elektrostymulacji zrostu kostnego na przebieg korozji implantów ze stali AISI 316L, pokrytych warstwą pasywną. Elektrostymulację przeprowadzano przez 28 dni w płynie fizjologicznym Tyrode'a o temperaturze 36,6±1°C, pH zmiennym w przedziale 7,6 - 8,6. Do elektrostymulacji

stosowano prąd stały o natężeniu 40 mA. Przebieg korozji badano przez pomiar ubytków masy implantów oraz ocenę uszkodzeń korozyjnych powierzchni.

Słowa kluczowe: implanty, stal AISI 316L, elektrostymulacja zrostu kostnego, traumatologia. [Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 21-26]

EVALUATION OF INFLUENCE OF THE BONE UNION ELECTROSTIMULATION ON CORROSION PROCESS OF THE IMPLANTS MADE OF Cr-Ni-Mo STEEL

Janusz Szewczenko, Zbigniew Paszenda, Jadwiga Tyrlik-Held, Jan Marciniak, Marcin Kaczmarek

Department of Biomedical Materials Engineering Silesian Technical University in Gliwice Abstract

The investigations on the influence of different methods of electrostimulation of the fractured bone union on corrosion of implants made of AISI 316L steel with a passive layer have been presented. The electrostimulation process was carried out for 28 days in physiological

Tyrode's solution at the temperature of 36.6 ± 1 oC and pH changing in the range 7.6-8.6. Direct current of 40 mA intensity was used for electrostimulation. The progress of corrosion was followed by measuring implant mass losses and by evaluating corrosion damages of the implant surfaces.

Key words: implants, AISI 316L steel, electrostimulation of bone union, traumatology [Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 21-26]

ELEKTROCHEMICZNE I KOROZYJNE WŁAŚCIWOŚCI TI6AL4V ELI W ROZTWORACH KWASU FOSFOROWEGO

Elżbieta Krasicka-Cydzik

Instytut Inżynierii Produkcji i Materiałoznawstwa Politechniki Zielonogórskiej Streszczenie

Barierowa warstwa tlenkowa wytworzona na powierzchni metalu podczas elektrochemicznej obróbki anodowej implantowych stopów tytanu w roztworach kwasu fosforowego posiada właściwości stymulujące procesy osseointegracji w środowisku biologicznym. W pracy przedstawiono badania wczesnych etapów anodowania stopu tytanu Ti6Al4V ELI w wodnych roztworach kwasu fosforowego o różnym stężeniu. Zastosowane techniki polaryzacyjne-potencjodynamiczna i galwanostatyczna - wykazały możliwość potwierdzenia na drodze elektroanalitycznej udziału jonów fosforanowych w procesie anodowania.

Słowa kluczowe: Ti6Al4V, anodowanie, krzywe polaryzacyjne

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 26-32]

ELECTROCHEMICAL AND CORROSION PROPERTIES OF TI6AL4V ELI IN

PHOSPHORIC ACID SOLUTIONS

Elżbieta Krasicka-Cydzik

Institute of Production Engineering and Materials Science, Technical University of Zielona Góra

Abstract

Barrier oxide films formed by electrochemical anodic treatment of implant titanium alloys in phosphoric acid solutions influence advantageously the stimulation of osteointegration processes in human body. The investigations of early stages of the Ti6Al4V ELI alloy oxidation in aqueous solutions of phosphoric acid of different concentrations are presented. The use of potentiodynamic and galvanostatic polarisation techniques revealed the possibility to confirm the electrochemical incorporation of phosphate ions into the surface oxide layer of

the alloy.

Key words: Ti6Al4V ELI, anodising, phosphoric acid, polarisation.

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 26-32]

BADANIA WYTRZYMAŁOŚCIOWE I MIKROSKOPOWE MINIPŁYTEK STOSOWANYCH W LECZENIU ZŁAMAŃ KOŚCI ŻUCHWY

Milewski G., Dziadur W.

Politechnika Krakowska

Streszczenie

Zastosowanie mikro lub minipłytek w leczeniu kości twarzo-czaszki uważa się obecnie za jedną z najskuteczniejszych metod chirurgii szczękowej. W pracy przedstawiono wyniki badań wytrzymałościowych i strukturalnych minipłytek z systemu Martina wykonanych ze stopu Cr-Ni-Mo stosowanych w osteosyntezie złamań trzonu żuchwy.

Badania wytrzymałościowe wykonano dla przypadku symulującego normalne obciążenie zgryzowe żuchwy. Badania strukturalne, stan powierzchni oraz warstwy pasywacyjnej minipłytek wykonano metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

Badaniom poddano minipłytki dziewicze oraz usunięte po okresie 6 - 15 miesięcy w wyniku różnych komplikacji pooperacyjnych (obnażenie wszczepu, stan zapalny, osteoliza). Badania wytrzymałościowe nie wykazały obniżenia wytrzymałości minipłytek w wyniku stanów zapalnych twardych tkanek żuchwy. Zaobserwowano natomiast częściowe osłabienie warstwy pasywacyjnej implantów.

Słowa kluczowe: badania wytrzymałościowe, badania strukturalne, minipłytki, osteosynteza Żuchwy

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 32-37]

STRENGTH AND MICROSCOPIC EXAMINATION OF MINIPLATES APPLIED IN TREATMENT OF MANDIBULAR FRACTURES

Milewski G., Dziadur W.

Cracow University of Technology

Abstract

Application of micro or miniplates in treatment of craniofacial bones is considered at present as one of the most efficient methods of facial surgery. The paper presents the results of strength and structural investigations of miniplates from the Martin system made of Cr-Ni-Mo alloy applied in osteosynthesis of mandibular body fractures.

Strength examination was done for the case simulating a normal occlusal loading of mandible. Structure investigation, surface state and passivation layer were studied by means of scanning electron microscopy (SEM).

Virgin miniplates as well as ones removed after 6 - 15 months due to various postoperative complications (implant baring, inflammation, osteolysis) were examined.

Strength examination did not indicate decrease strength of the miniplates due to the inflammatory states of hard tissues of mandible. However, partial loss of passivation layer of implants was observed.

Key words: strength examination, structural investigation, miniplates, mandibular osteosynthesis

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 32-37]

BADANIA KOMPOZYTU WĘGLOWEGO W MIKROSKOPIE SKANINGOWYM PO WSZCZEPIENIU DO TKANKI KOSTNEJ ZWIERZĄT

Grzegorz Bajor*, Zbigniew Paszenda**, Janusz Bohosiewicz*, Jan Marciniak** * II Katedra i Klinika Chirurgii Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej w Bytomiu ** Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych Politechniki Śląskiej w Gliwicach Streszczenie

Podjęte badania kompozytu węglowego na wybranym do doświadczenia modelu zwierzęcym jakim był królik w okresie wzrostu kostnego miały wykazać przydatność tego materiału w

chirurgii dziecięcej, szczególnie w traumatologii. Do doświadczenia użyto 16 królików, którym wszczepiano do światła kanału szpikowego grot węglowy. Materiał doświadczalny podzielono na trzy grupy w zależności od sposobu pokrycia podstawowego kompozytu węgiel-węgiel. W pracy przeprowadzono badania strefy rozdziału implant węglowy-tkanka kostna oraz powierzchni bocznej implantu węglowego. Obserwacje prowadzono w elektronowym mikroskopie skaningowym DSM - 940 firmy OPTON. Dla potrzeb badań przygotowano przekroje poprzeczne implantu węglowego łącznie z tkanką kostną. We wszystkich postaciach badanego kompozytu obserwowano postępującą od obwodu implantu biodegradację oraz powstawanie na tym miejscu nowej tkanki kostnej. W oparciu o przeprowadzone obserwacje uzyskano zachęcające wyniki doświadczalne stwarzające kliniczne możliwości zastosowania tych materiałów w traumatologii dziecięcej. Słowa kluczowe: biomateriały, materiały węglowe, kompozyt węgiel-węgiel, badania doświadczalne, pirowęgiel, hydroksyapatyt.

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 37-43]

SEM EXAMINATION OF CARBON COMPOSITE IMPLANTED INTO THE ANIMALS BONE TISSUE

Grzegorz Bajor*, Zbigniew Paszenda**, Janusz Bohosiewicz*, Jan Marciniak** *Department of Paediatric Surgery in Bytom, Silesian Medical Academy in Katowice **Institute of Engineering and Biomedical Materials, Silesian Technical University in Gliwice

Abstract

Behaviour of carbon composite implanted in an animal model, being rabbit in the period of the osseous tissue growth, was examined in order to assess the usability of this material in paediatric surgery, especially in traumatology. Sixteen rabbits were used for the experiment in which carbon pin was inserted into the marrow cavity. The experimental material was divided into three groups, depending on the way the basic carbon-carbon composite was coated. Investigations of the carbon implant - bone tissue separation zone and of the lateral surface of the carbon implant were carried out within the project framework. Observations were carried out under the OPTON DSM-940 scanning electron microscope (SEM). Cross-sections of the carbon implant along with the bone tissue were prepared for the examination. In all investigated cases, biodegradation progressing from the implant circumference was observed as well as development of a new bone tissue at the same place. The encouraging experimental results obtained in this work indicate that clinical use of these materials in the paediatric traumatology is possible.

Keywords: biomaterials, carbon-carbon composite, experimental studies, pyrocarbon, hydroxyapatite.

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 37-43]

PROTEZA KOŃCZYNY MIEDNICZNEJ U PSA-OPIS PRZYPADKU. Jacek Sterna Katedra Chirurgii Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie [Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 44-45] PROSTHESIS OF THE PELVIC LIMB IN THE DOG- CASE REPORT Jacek Sterna Department of Surgery Warsaw Agricultural University

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 44-45]

BADANIE WPŁYWU MATERIAŁÓW HEMOSTATYCZNYCH NA PARAMETRY UKŁADU KRZEPNIĘCIA I FIBRYNOLIZĘ

Maria Szymonowicz*, Jakub Kratochwil**, Roman Rutowski*, Jolanta Staniszewska-Kuś*, Danuta Paluch*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Katedry Chirurgii Urazowej Akademii Medycznej we Wrocławiu

**Okręgowy Szpital Kolejowy we Wrocławiu

Streszczenie

W pracy przedstawiono ocenę wpływu wchłanialnych materiałów hemostatycznych na układ krzepnięcia i fibrynolizę. W osoczu cytrynianowym ubogopłytkowym oznaczono wybrane parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy. Badania wykonano przed i po czasowym kontakcie z materiałami hemostatycznymi. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że materiał Spongostan nie wpływa na aktywność białek układu krzepnięcia i fibrynolizy, natomiast materiał Surgicel powoduje ich inaktywację, a materiał TachoComb tworzy skrzep fibrynowy bez udziału osoczowych składników krzepnięcia.

Słowa kluczowe: materiały hemostatyczne, badania in vitro osocza, parametry układu krzepnięcia i fibrynolizy

[Inzynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 45-52]

EVALUATION OF THE INFLUENCE OF TOPICAL HAEMOSTATICS MATERIALS ON COAGULATION AND FIBRINOLYSIS PARAMETERS

Maria Szymonowicz*, Jakub Kratochwil**, Roman Rutowski*, Jolanta Staniszewska-Kuś*, Danuta Paluch*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Institute of Experimental Surgery and Biomaterials Research, The Chair and Clinic of Traumatology and Hand Surgery, Medical Academy, Wrocław.

**District Railway Hospital in Wrocław

Abstract

In this paper the influence of absorbable topical haemostatic materials on coagulation and fibrynolysis was evaluated. The parameters of coagulation and fibrinolysis were determined after a certain time of incubation in human citrated plasma. It has been stated that Spongostan has no influence on the activity of proteins of coagulation and fibrinolysis, Surgicel deactivates them and TachoComb creates fibrin clot without plasma coagulation proteins. Key words: topical haemostats, plasma in vitro tests, parameters of coagulation and fibrinolysis

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 45-52]

BADANIA BIOLOGICZNE WŁÓKIEN Z DIBUTYRYLOCHITYNY

Danuta Paluch*, Lidia Szosland**, Jerzy Kołodziej*, Jolanta Staniszewska-Kuś*,

Maria Szymonowicz*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Katedry Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki Akademii Medycznej we Wrocławiu

**Katedra Chemii Fizycznej Polimerów Politechniki Łódzkiej w Łodzi Streszczenie

Opracowana w Katedrze Chemii Fizycznej Polimerów metoda otrzymywania

dibutyrylochityny przy użyciu kwasu nadchlorowego jako katalizatora reakcji estryfikacji chityny posiada szereg zalet: jest prosta, szybka i daje powtarzalne wyniki. Metoda ta powoduje znaczną degradację chityny, jednak nadal można otrzymać produkty reakcji o dostatecznie wysokiej masie cząsteczkowej o własnościach błono- i włóknotwórczych. Szereg doskonałych własności dibutyrylochityny, takich jak dobra rozpuszczalność w popularnych rozpuszczalnikach organicznych, bioaktywność, odporność na gamma radiacje, zdolność tworzenia błon, mikrosfer i włókien czynią z niej polimer o dużych możliwościach w ewentualnym stosowaniu do celów biomedycznych. Celem pracy była ocena biozgodności włókien z dibutyrylochityny.Badania obejmowały: 1. Badania biologiczne wyciągów wodnych:

- Badania działania cytotoksycznego;
- Badania działania hemolitycznego;
- Badanie śródskórnego działania drażniącego.
- 2. Badania implantacyjne:
- Badania odczynu tkanek po implantacji do jamy otrzewnowej myszy;
- Ocenę zmian w poziomie cytokin IL 1b i IL 6

w płynie z jamy otrzewnowej myszy po implantacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włókna z dibutyrylochityny nie wykazują działania toksycznego, nie wywołują zmian ogólnoustrojowych oraz nie wywołują istotnego wzrostu poziomu cytokin IL-1 b i IL-6 po implantacji włókien z DBCH na okres 7, 14, 21, 28 i 60 dni. Implantowane do jamy otrzewnowej, wywołują dość nasilony odczyn zapalny.

Słowa kluczowe: dibutyrylochityna, badania biologiczne in vitro, badania implantacyjne, interleukina 1b i 6.

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 53-60]

A BIOLOGICAL INVESTIGATION OF DIBUTYRYLCHITIN FIBRES

Danuta Paluch*, Lidia Szosland**, Jerzy Kołodziej*, Jolanta Staniszewska-Kuś*,

Maria Szymonowicz*, Leszek Solski*, Bogusława Żywicka*

*Institute of Experimental Surgery and Biomaterials Research, The Chair and Clinic of

Traumatology and Hand Surgery, Medical Academy, Wrocław.

** Department of Physical Chemistry of Polymers,

Technical University of Łódź,

Abstract

The procedure of preparation of dibutyrylchitin using perchloric acid as a cheap and easily available catalyst of chitin esterification, evaluated at the Division of Physical Chemistry of Polymers, has a number of advantages: it is simple, quick and reproducible. This method promotes significant degradation of chitin. However, it is possible to synthesise a polymer with a molecular mass high enough to from strong films, fibres or microspheres. Butyrylation of chitin gives a high yield of easily soluble products with a degree of substitution ca 2. Excellent properties of dibutyrylchitin such as easy solubility in common organic solvents, bioactivity, resistance to gamma irradiation, ability to form films, fibres and microspheres enable its wide application in medicine. The main target of our investigation was to evaluate the biocompatibility of dibutyrylchitin fibres.

Our investigation included:

1. Biological properties of aqueous extracts:

· cytotoxicological effect;

· haemolytic effect;

· intracutaneous reactivity test.

2. Evaluation after implantation:

• evaluation of tissue reaction after mouse intraperitoneal implantation;

 \cdot assessment of the changes in the level of cytokines IL 1b and IL 6 in the intraperitoneal liquids of mice after implantation.

In the conclusion we can say that the dibutyrylchitin fibres do not have any toxicological properties, they give neither local nor all body reactions. They do not cause significant increase in the level of interleukins IL-1b or IL-6. After implantation into mouse peritoneal cavity the fibres caused fairly intense inflammation.

Key words: dibutyrylchityn, biological investigation in vitro, evaluation after implantation, interleukin 1b and 6.

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 53-60]

KRAJOWE PROCEDURY NORMALIZACYJNE DOTYCZĄCE BIOMATERIAŁÓW NA PRZYKŁADZIE NORMY ISO-10993: BIOLOGICZNA OCENA WYROBÓW MEDYCZNYCH

Leszek Solski*, Danuta Paluch* Leszek Krzywosiński**

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu

**Polski Komitet Normalizacyjny, Zespół Zagadnień Ogólnych, Ochrony Zdrowia i Środowiska w Warszawie

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 60-65]

POLISH STANDARISATION PROCEDURES RELATED TO BIOMATERIALS ON THE PARTICULAR EXAMPLE OF ISO-10993: BIOLOGICAL EVALUATION OF MEDICAL DEVICES

Leszek Solski*, Danuta Paluch*, Leszek Krzywosiński**

*Institute of Experimental Surgery and Biomaterials Research Wroclaw University of Medicine

** Polish Committee for Standardization, Dept. of Health and Environmental Protection [Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 60-65]

WARSTWY DIAMENTOWE NA IMPLANTACH DLA TRAUMATOLOGII

S. Mitura*, J. Marciniak**, P. Niedzielski*, Z. Paszenda**

*Instytut Inżynierii Materiałowej i Technik Bezwiórowych, Politechnika Łódzka w Łodzi ** Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Politechnika Śląska w Gliwicach Streszczenie

Opracowano technikę wytwarzania powłok pasywno - diamentowych na implantach ze stali Cr-Ni-Mo stosowanych w traumatologii. Przeprowadzono badania struktury warstwy oraz jej własności fizykoche-micznych w stymulowanych warunkach laboratoryjnych, głównie ze względu na odporność korozyjną. Oceniono także biotolerancję uszlachetnionych implantów w tkankach zwierząt doświadczalnych oraz w badaniach klinicznych. Nowa jakość implantów gwarantuje w pełni dobre cechy użytkowe. Uzyskane wyniki są obiecujące dla perspektywicznych zastosowań klinicznych.

Słowa kluczowe: chirurgia kostna, traumatologia, biomateriały metaliczne, warstwy diamentowe, własności fizykochemiczne biomateriałów metalicznych

[Inżynieria Biomateriałów, 7-8, (1999), 65-72]

DIAMOND-COATED IMPLANTS FOR TRAUMATOLOGY

S. Mitura*, J. Marciniak **, P. Niedzielski*, Z. Paszenda**

· Institute of Materials Science and Engineering, Technical University of Łódź, Łódź

· ** Institute of Engineering and Biomedical Materials, Technical University of Silesia,

Gliwice

Abstract

A method of deposition of passive-diamond coatings onto implants made of Cr-Ni-Mo steels applied in traumatology has been developed. Structure of the layer as well as its physicochemical properties under stimulated experimental conditions, mainly with respect to its corrosion resistance, have been investigated. Moreover, biotolerance of improved implants in tissues of experimental animals and during clinical examinations has been evaluated. The new quality of implants guarantees good useful properties. The obtained results are promising for future clinical applications.

Key words: osteopedic surgery, traumatology, metallic biomaterials, diamond layers, physicochemical properties of metallic biomaterials

[Engineering of Biomaterials, 7-8, (1999), 65-72]