

# ENGINEERING OF BIOMATERIALS

INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW  
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW  
I WYDZIAŁU INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH

**Number 81-84**

Numer 81-84

**Volume XI**

Rok XI

**Wydanie specjalne**

Special edition

**DECEMBER 2008**

GRUDZIEN 2008

**ISSN 1429-7248**

**PUBLISHER:**

WYDAWCA:

**Polish Society  
for Biomaterials  
in Cracow**

Polskie  
Stowarzyszenie  
Biomateriałów  
w Krakowie

**EDITORIAL  
COMMITTEE:**

KOMITET  
REDAKCYJNY:

**Editor-in-Chief**

Redaktor naczelny  
**Jan Chłopek**

**Editor**

Redaktor  
**Elżbieta Pamuła**

**Secretary of editorial**

Sekretarz redakcji  
**Katarzyna Trała**

**Design**

Projekt  
**Augustyn Powroźnik**

**ADDRESS OF  
EDITORIAL OFFICE:**

ADRES REDAKCJI:

**AGH-UST  
al. Mickiewicza 30/A3  
30-059 Cracow, Poland**

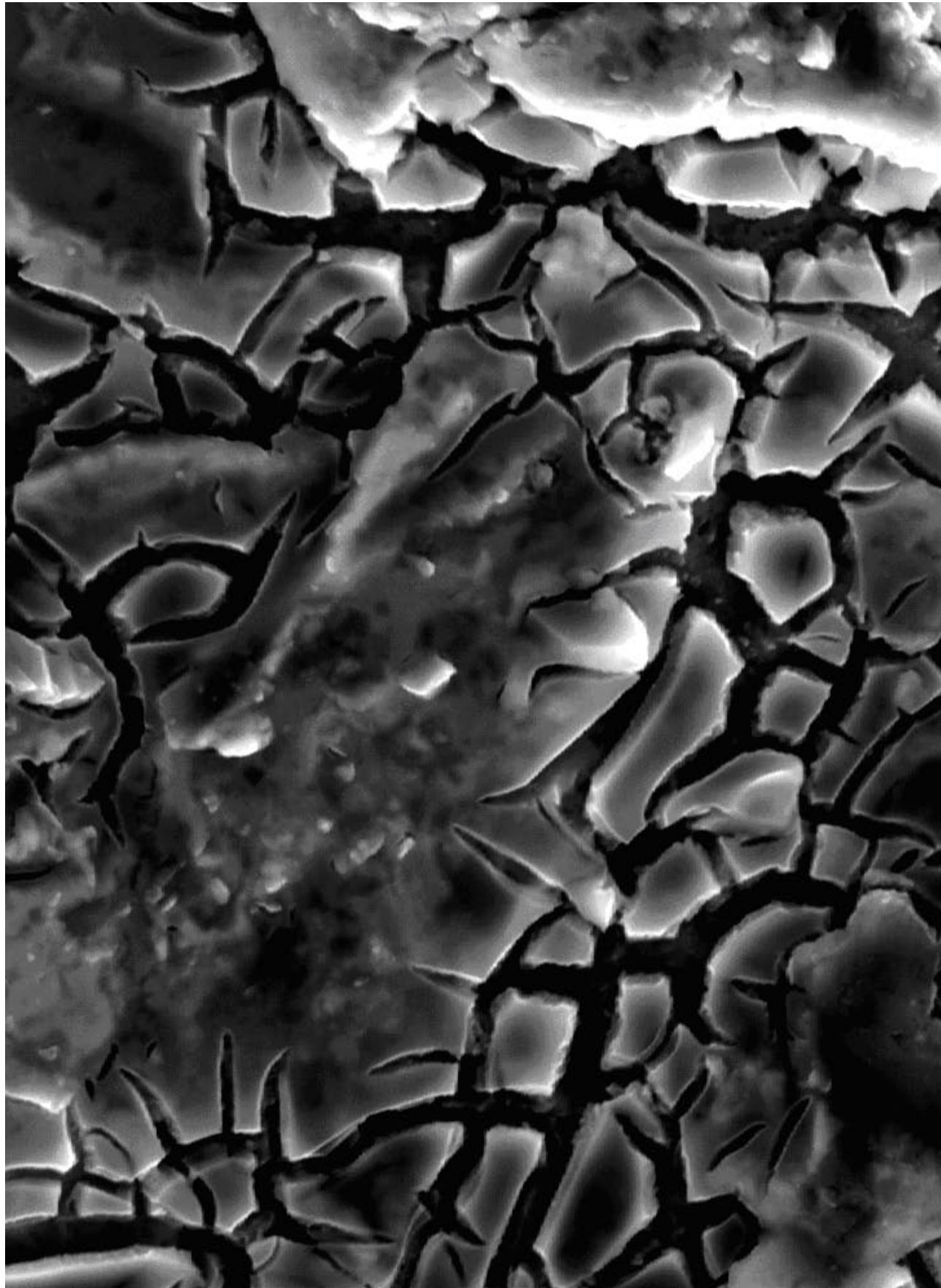
Akademia  
Górnictwo-Hutnicza  
al. Mickiewicza 30/A-3  
30-059 Kraków

**Issue: 200 copies**

Nakład: 200 egz.

**Scientific Publishing  
House AKAPIT**

Wydawnictwo Naukowe  
AKAPIT  
e-mail: [wn@akapit.krakow.pl](mailto:wn@akapit.krakow.pl)



# **INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD**

## **MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY**

**Iulian Antoniac**  
UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA

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

**Romuald Bedziński**  
POLITECHNIKA WROCLAWSKA / WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Marta Błażewicz**  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Błażewicz**  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Maria Borczuch-Łączka**  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Tadeusz Cieślik**  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA

**Jan Ryszard Dąbrowski**  
POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA / BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

**Andrzej Górecki**  
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Robert Hurt**  
BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA

**James Kirkpatrick**  
JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY

**Wojciech Maria Kuś**  
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Małgorzata Lewandowska-Szumieł**  
WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY / MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

**Jan Marciniak**  
POLITECHNIKA ŚLĄSKA / SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**Sergey Mikhailovsky**  
UNIVERSITY OF BRIGHTON, GREAT BRITAIN

**Stanisław Mitura**  
POLITECHNIKA ŁÓDZKA / TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

**Roman Pampuch**  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Stanisław Pielka**  
AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU / WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY

**Jacek Składzień**  
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, KRAKÓW /  
JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, CRACOW

**Anna Ślósarczyk**  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW / AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

**Tadeusz Trzaska**  
AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO, POZNAŃ / UNIVERSITY SCHOOL OF PHYSICAL EDUCATION, POZNAŃ

**Dimitris Tsipas**  
ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

## Wskazówki dla autorów

1. Prace do opublikowania w kwartalniku „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.
2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane\*.  
(\*Prace nierecenzowane, w tym materiały konferencyjne, będą drukowane w numerach specjalnych pod koniec roku kalendarzowego.)
3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres redakcji na płytach CD wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.
4. Struktura artykułu:  
• TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo
5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).
6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany.
7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem.
8. Opinia lub uwagi recenzenta będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.
9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.
10. Adres redakcji:

Czasopismo  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki  
al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl  
www.biomat.krakow.pl

## Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przysyłać na adres:  
apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41

Konto:  
Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów  
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3  
Bank Śląski S.A. O/Kraków,  
nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001  
Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

## Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly magazine „Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów” should be written in English.
2. All articles are reviewed\*.  
(\* Non-reviewed articles, including conference materials, will be printed in special issues at the end of the year.)
3. Manuscripts should be submitted to Editor’s Office on CD with a printout, drawings and photos.
4. A manuscript should be organized in the following order:  
• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words) • Keywords (4-6) • Introduction • Materials and methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References
5. Authors’ full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...
6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif, .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.
7. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.
8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our magazine.
9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.
10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.
11. Manuscripts should be submitted for publication to:

Journal  
„Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów”  
AGH University of Science and Technology  
Faculty of Materials Science and Ceramics  
30/A-3, Mickiewicza Avenue, 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38  
tel./fax: (48 12) 617 45 41  
e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl  
www.biomat.krakow.pl

## Subscription terms

Subscription rates:  
Cost of one number: 20 PLN

Payment should be made to:  
Polish Society for Biomaterials  
30/A3 Mickiewicz Avenue  
30-059 Cracow, Poland  
Bank Slaski S.A. O/Krakow  
account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

## SPIS TREŚCI

<b>OCENA WPŁYWU MIKROSTRUKTURY ŁAŃCUCHA KOPOLIMEROWEGO NA KINETYKĘ UWALNIANIA CYKLOSPORINY A (CyA) I RAPAMYCYN Z MATRYC WYKONANYCH Z POLI(L-LAKTYDO-KO-GLIKOLIDU)</b>	<b>1</b>
K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, B.JARZĄBEK, K.GĘBAROWSKA, J.JAWORSKA	
<b>OCENA BIOZGODNOŚCI BIORESORBOWALNYCH MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH WOBEC LUDZKICH FIBROBLASTÓW</b>	<b>5</b>
A.ORCHEL, K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, J.ORCHEL, Z.DZIERŻEWICZ	
<b>WZROST I RÓŻNICOWANIE LUDZKICH CHONDROCYTÓW HODOWANYCH NA BIODEGRADOWALNYCH TRÓJWYMIAROWYCH NOŚNIKACH POLIMEROWYCH</b>	<b>8</b>
J.ORCHEL, A.ORCHEL, J.KASPERCZYK, E.PAMUŁA, P.PADUSZYŃSKI, P.DOBRZYŃSKI, A.PAŁASZ, I.BIELECKI, K.JELONEK, Z.DZIERŻEWICZ	
<b>PROJEKTOWANIE BIOMATERIAŁÓW GRADIENTOWYCH O ZAŁOŻONYCH MODUŁACH YOUNGA I ICH ANALIZA EKSPERYMENTALNA</b>	<b>12</b>
J.CHŁOPEK, K.MIGACZ	
<b>MODYFIKACJA WAPNIEM I FOSFOREM WARSTEWKI TLENKOWEJ NA STOPIE Ti6Al7Nb</b>	<b>16</b>
W.SIMKA, G.NAWRAT, A.IWANIAK	
<b>OCENA WPŁYWU KOMPOZYTÓW P(LLA/GA) Z WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI ORAZ P(LLA/GA) Z FOSFORANEM TRÓJWAPNIOWYM NA PROCES GOJENIA TKANKI KOSTNEJ- BADANIA IN VIVO NA POSTAWIE WYBRANYCH PARAMETRÓW</b>	<b>21</b>
T.CIEŚLIK, M.ADWENT, J.CHŁOPEK, A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.CIEŚLIK, J.MAJCHERCZYK	
<b>OCENA WPŁYWU WARUNKÓW IN VITRO NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE POLIMERÓW RESORBOWALNYCH O RÓŻNYM CZASIE RESORPCJI</b>	<b>25</b>
J.CHŁOPEK, A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, M.EL FRAY	

STRESZCZANE W *APPLIED MECHANICS REVIEWS*  
 ABSTRACTED IN *APPLIED MECHANICS REVIEWS*

## CONTENTS

<b>THE INFLUENCE OF COPOLYMER CHAIN MICROSTRUCTURE ON CYCLOSPORINE A (CyA) AND RAPAMYCINE RELEASE FROM MATRICES OBTAINED FROM POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE)</b>	<b>1</b>
K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, B.JARZĄBEK, K.GĘBAROWSKA, J.JAWORSKA	
<b>BIOCOMPATIBILITY OF BIODEGRADABLE SYNTHETIC POLYMERS FOR HUMAN FIBROBLASTS</b>	<b>5</b>
A.ORCHEL, K.JELONEK, J.KASPERCZYK, P.DOBRZYŃSKI, J.ORCHEL, Z.DZIERŻEWICZ	
<b>GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HUMAN CHONDROCYTES ON BIODEGRADABLE POLYMERIC SCAFFOLDS</b>	<b>8</b>
J.ORCHEL, A.ORCHEL, J.KASPERCZYK, E.PAMUŁA, P.PADUSZYŃSKI, P.DOBRZYŃSKI, A.PAŁASZ, I.BIELECKI, K.JELONEK, Z.DZIERŻEWICZ	
<b>PLANS OF GRADIENT BIOMATERIALS WITH ASSUMPTED YOUNG'S MODULUS AND THEIR ANALYSIS</b>	<b>12</b>
J.CHŁOPEK, K.MIGACZ	
<b>MODIFICATION OF OXIDE LAYER BY CALCIUM AND PHOSPHORUS ON Ti6Al7Nb ALLOY</b>	<b>16</b>
W.SIMKA, G.NAWRAT, A.IWANIAK	
<b>THE INFLUENCE OF P(LLA/GA) WITH CARBON FIBERS AND P(LLA/GA) WITH TRICALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE MATERIALS ON THE PROCESSES OF BONE HEALING - IN VIVO STUDIES BASED ON THE CHOSEN PARAMETERS</b>	<b>21</b>
T.CIEŚLIK, M.ADWENT, J.CHŁOPEK, A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.CIEŚLIK, J.MAJCHERCZYK	
<b>INFLUENCE OF IN VITRO CONDITIONS ON MECHANICAL PROPERTIES OF RESORBABLE POLYMERS WITH DIFFERENT RESORPTION TIME</b>	<b>25</b>
J.CHŁOPEK, A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, M.EL FRAY	

WYDANIE DOFINANSOWANE PRZEZ MINISTRA NAUKI  
 I SZKOLNICTWA WYŻSZEGO  
 EDITION FINANCED BY THE MINISTER OF SCIENCE  
 AND HIGHER EDUCATION

**BADANIA REAKTYWNOŚCI LEUKOCYTÓW KRWI  
PO KONTAKCIE Z MATRYCAMI ŻELATYNO-  
ALGINIANOWYMI**

M.SZYMONOWICZ, A.PLISZCZAK-KRÓL, S.PIELKA,  
J.KRÓL, S.GRACZYK, D.HAZNAR, J.PLUTA

29

**BADANIA NAD ZWIĘKSZENIEM FUNKCJONAL-  
NOŚCI EKTOPROTEZ SILIKONOWYCH**

E.STODOLAK, H.MATRASZEK, A.GÓRA, S.BŁĄŻEWICZ

31

**OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI KOPOLIMERU  
GLIKOLIDU Z LAKTYDEM (PLGA)  
W WARUNKACH IN VITRO**

M.CIEŚLIK, W.KRÓL, A.MERTAS,  
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK

35

**WPŁYW WZMOCNIONEGO WŁÓKNAMI  
WĘGLOWYMI KOPOLIMERU GLOKOLIDU  
Z LAKTYDEM NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ**

M.CIEŚLIK, W.KRÓL, A.MERTAS,  
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK

40

**WPŁYW FLUORYZACJI I PIASKOWANIA  
POWIERZCHNI SZKLIWA NA ADHEZJĘ  
ZAMKÓW ORTODONTYCZNYCH**

K.JANKOWSKA, D.KOŚCIELNIAK, M.DWORAK, E.PAMUŁA

45

**OTRZYMYWANIE POROWATEGO TYTANU  
NA IMPLANTY MEDYCZNE**

B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK,  
S.PAPARGYRI, D.TSIPAS

49

**WŁAŚCIWOŚCI WOLNORODNIKOWE GAMMA  
NAPROMIENIOWANYCH STAŁYCH POSTACI  
LEKÓW**

S.WILCZYŃSKI, B.PILAWA, M.PTASZKIEWICZ,  
J.SWAKOŃ, P.OLKO

52

**ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII EPR  
DO BADANIA DEKSAMETAZONU  
STERYLIZOWANEGO TERMICZNIE**

M.KOŚCIELNIAK, B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI

55

**ANALIZA UKŁADU CENTRÓW PARA-  
MAGNETYCZNYCH W TERMICZNIE  
STERYLIZOWANYM DIKLOFENAKU**

B.PILAWA, P.RAMOS, S.WILCZYŃSKI, K.CZYŻ

57

**BADANIA WOLNYCH RODNIKÓW POLIMERÓW  
MELANINOWYCH W PRODUKTACH  
KOSMETYCZNYCH Z ZASTOSOWANIEM  
SPEKTROSKOPII ELEKTRONOWEGO  
REZONANSU PARAMAGNETYCZNEGO**

E.CHODUREK, D.CZYŻYK, B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI

59

**WOLNE RODNIKI W STERYLIZOWANYM  
TERMICZNIE PREDNIZOLONIE**

M.KOŚCIELNIAK, S.WILCZYŃSKI, B.PILAWA

61

**OCENA KONCENTRACJI, TRWAŁOŚCI I TYPU  
WOLNYCH RODNIKÓW POWSTAJĄCYCH  
W TRAMADOLU POD WPŁYWEM WYSOKIEJ  
TEMPERATURY**

B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI, P.RAMOS, A.TOMASIK

63

**STUDIES OF THE REACTIVITY OF LEUCOCYTES  
AFTER CONTACT WITH GELATINE-ALGINATE  
MATRIXES**

M.SZYMONOWICZ, A.PLISZCZAK-KRÓL, S.PIELKA,  
J.KRÓL, S.GRACZYK, D.HAZNAR, J.PLUTA

29

**INVESTIGATIONS ON IMPROVEMENT OF FUNCTIO-  
NALITY OF SILICONE ECTOPROSTHESES**

E.STODOLAK, H.MATRASZEK, A.GÓRA, S.BŁĄŻEWICZ

31

**CYTOTOXICITY OF POLYLACTIDE-CO-GLYCOLIDE  
(PLGA) – EVALUATING IN VITRO**

M.CIEŚLIK, W.KRÓL, A.MERTAS,  
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK

35

**THE IMPACT OF POLYLACTIDE-CO-GLYCOLIDE  
REINFORCED WITH CARBON FIBRES  
ON CELLULAR RESPONSE**

M.CIEŚLIK, W.KRÓL, A.MERTAS,  
A.MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK

40

**EFFECTS OF ENAMEL FLUORIDATION AND AIR  
POLISHING ON ADHESION OF ORTHODONTIC  
BRACKETS**

K.JANKOWSKA, D.KOŚCIELNIAK, M.DWORAK, E.PAMUŁA

45

**OBTAINING OF POROUS TITANIUM  
FOR MEDICAL IMPLANTS**

B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, J.CHŁOPEK,  
S.PAPARGYRI, D.TSIPAS

49

**FREE RADICALS PROPERTIES  
OF GAMMA IRRADIATED  
SOLID FORMS OF DRUGS**

S.WILCZYŃSKI, B.PILAWA, M.PTASZKIEWICZ,  
J.SWAKOŃ, P.OLKO

52

**APPLICATION OF EPR SPECTROSCOPY  
TO EXAMINATION OF THERMALLY  
STERILIZED DEXAMETHASONE**

M.KOŚCIELNIAK, B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI

55

**FREE RADICALS SYSTEM ANALYSIS IN  
THERMALLY STERILIZED DICLOFENAC**

B.PILAWA, P.RAMOS, S.WILCZYŃSKI, K.CZYŻ

57

**ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE  
STUDIES OF FREE RADICALS OF MELANIN  
POLYMERS IN COSMETIC PRODUCTS**

E.CHODUREK, D.CZYŻYK, B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI

59

**FREE RADICALS IN THERMALLY STERILIZED  
PREDNISOLONE**

M.KOŚCIELNIAK, S.WILCZYŃSKI, B.PILAWA

61

**EVALUATION OF CONCENTRATION, STABILITY  
AND TYPES OF FREE RADICALS GENERATED  
IN TRAMADOLE EXPOSED TO HIGH  
TEMPERATURE**

B.PILAWA, S.WILCZYŃSKI, P.RAMOS, A.TOMASIK

63

**MODELOWE BADANIA EPR WPŁYWU STĘŻENIA LEKU NA WŁAŚCIWOŚCI CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH W KOMPLEKSACH BIOPOLIMERU MELANINOWEGO Z NETILMICYNĄ** 65

B.PILAWA, M.ZDYBEL, E.BUSZMAN, D.WRZEŚNIOK, J.MROCHEN

**BADANIA EPR ODDZIAŁYWAŃ SPIN-SIEĆ W KOMPLEKSACH MODELOWEJ EUMELANINY Z NETILMICYNĄ I JONAMI Cu(II)** 67

M.ZDYBEL, B.PILAWA, E.BUSZMAN, D.WRZEŚNIOK, R.KRZYMINIEWSKI, Z.KRUCZYŃSKI

**ODDZIAŁYWANIA BIOFIZYCZNE FOTOU CZULACZY STOSOWANYCH W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ** 68

M.KOŚCIELNIAK, J.ADAMCZYK, B.PILAWA

**WŁÓKNA Z ALGINIANU WAPNIA ZAWIERAJĄCE NANOHYDROKSYAPATYT** 70

M.BOGUŃ, E.STODOLAK

**WŁÓKNA POLIAKRYLONITRYLOWE MODYFIKOWANE NANODODATKIEM SREBRA ORAZ UKŁADEM DWÓCH NANODODATKÓW: SREBRA I HYDROKSYAPATYTU** 73

T.MIKOŁAJCZYK, G.SZPARAGA

**RUSZTOWANIA HYDROKSYAPATYTOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH WYKONANE METODĄ "ROBOCASTING" – WSTĘPNE TESTY** 76

K.GRYŃ, J.CHŁOPEK

**BADANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH SKÓRY** 77

S.SZOTEK, R.BĘDZIŃSKI, M.KOBIELARZ, B.ŻYWICKA, S.PIELKA, P.KUROPKA

**TRANSPORT MASY ZWIĄZANY Z IMPLANTACJĄ BIOCERAMIKI W ZAGADNIENIACH ZESPALANIA TKANKI KOSTNEJ** 79

M.WÓJCIK

**WPŁYW BIOMATERIAŁÓW NA PRZYLEGANIE I AKTYWNOŚĆ MYSICH FIBROBLASTÓW L929** 83

A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, E.PAMUŁA, B.PŁYTYCZ, E.KOŁACZKOWSKA

**WPŁYW CHROPOWATOŚCI PODŁOŻA NA TOPOGRAFIĘ WARSTW TiO<sub>2</sub> I SiO<sub>2</sub> NAKŁADANYCH METODĄ ZOL-ŻEL** 87

R.BĘDZIŃSKI, J.FILIPIAK, C.PEZOWICZ, J.KRZAK-ROŚ, M.KOWALSKI

**WSTĘPNE BADANIA NAD WYTWORZENIEM GĄBEK MAGNEZOWYCH INFILTROWANYCH POLIMEREM RESORBOWALNYM** 90

B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, K.ZYGMUNT, R.KUCHARSKI, J.CHŁOPEK

**WŁÓKNA W MEDYCYNIE I W INŻYNIERII BIOMATERIAŁÓW – PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ** 93

I.RAJZER, J.GRZYBOWSKA-PIETRAS, J.JANICKI

**WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE I STRUKTURALNE TĘTNIAKÓW AORTY BRZUSZNEJ** 98

M.KOBIELARZ, S.SZOTEK, P.KUROPKA, K.KALETA

**MODEL EPR STUDIES OF INFLUENCE OF DRUG CONCENTRATION ON PROPERTIES OF PARAMAGNETIC CENTRES IN COMPLEXES OF MELANIN BIOPOLYMER WITH NETILMICIN** 65

B.PILAWA, M.ZDYBEL, E.BUSZMAN, D.WRZEŚNIOK, J.MROCHEN

**EPR STUDIES OF SPIN-LATTICE INTERACTIONS IN MODEL EUMELANIN COMPLEXES WITH NETILMICIN AND Cu(II)** 67

M.ZDYBEL, B.PILAWA, E.BUSZMAN, D.WRZEŚNIOK, R.KRZYMINIEWSKI, Z.KRUCZYŃSKI

**BIOPHYSICAL INTERACTIONS OF PHOTOSENSITIZERS APPLIED IN PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS** 68

M.KOŚCIELNIAK, J.ADAMCZYK, B.PILAWA

**CALCIUM ALGinate FIBRES CONTAINING NANOHYDROXYAPATITE** 70

M.BOGUŃ, E.STODOLAK

**POLYACRYLONITRILE FIBRES MODIFIED WITH A SILVER NANO-ADDITIVE AND A SYSTEM OF TWO NANOADDITIVES: SILVER AND HYDROXYAPATITE** 73

T.MIKOŁAJCZYK, G.SZPARAGA

**HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS BY "ROBOCASTING" FOR MEDICAL APPLICATIONS – PRELIMINARY TESTS** 76

K.GRYŃ, J.CHŁOPEK

**INVESTIGATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF THE SKIN** 77

S.SZOTEK, R.BĘDZIŃSKI, M.KOBIELARZ, B.ŻYWICKA, S.PIELKA, P.KUROPKA

**MASS TRANSPORT RELATED WITH BIOCERAMIC IMPLANTATION IN TISSUE OSTEOSYNTHESIS PROBLEMS** 79

M.WÓJCIK

**EFFECTS OF BIOMATERIALS ON ADHESION AND ACTIVITY OF MURINE FIBROBLASTS L929** 83

A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, E.PAMUŁA, B.PŁYTYCZ, E.KOŁACZKOWSKA

**INFLUENCE OF SUBSTRATE ROUGHNESS ON TiO<sub>2</sub> AND SiO<sub>2</sub> COATING TOPOGRAPHY COATED BY FUNCTIONAL SOL-GEL DERIVED LAYERS** 87

R.BĘDZIŃSKI, J.FILIPIAK, C.PEZOWICZ, J.KRZAK-ROŚ, M.KOWALSKI

**PRELIMINARY STUDY OF THE MAGNESIUM SPONGES INFILTRATED WITH RESORBABLE POLYMER** 90

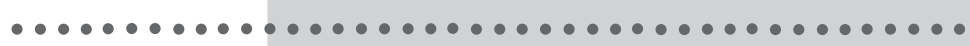
B.SZARANIEC, M.ZIĄBKA, K.ZYGMUNT, R.KUCHARSKI, J.CHŁOPEK

**FIBERS IN MEDICINE AND BIOMATERIALS ENGINEERING – REVIEW OF APPLICATIONS** 93

I.RAJZER, J.GRZYBOWSKA-PIETRAS, J.JANICKI

**MECHANICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS** 98

M.KOBIELARZ, S.SZOTEK, P.KUROPKA, K.KALETA



**BADANIE BIOZGODNOŚCI KOMÓRKOWEJ  
IN VITRO NANOSTRUKTURALNYCH  
ELASTOMERÓW TERMOPLASTYCZNYCH  
DLA IMPLANTÓW TKANKI MIĘKKIEJ** 100  
M.EL FRAY, M.PIĄTEK

**WPŁYW WYSOKOENERGETYCZNEGO  
PROMIENIOWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI  
BIOMATERIAŁÓW ZAWIERAJĄCYCH  
NANONAPEŁNIACZE** 104  
M.PIĄTEK, M.EL FRAY, G.PRZYBYTNIK, M.WALO

**ENDOTHELIAL CELLS ON PET VASCULAR  
PROSTHESES IMPREGNATED WITH POLYESTER-  
BASED COPOLYMERS AND COATED  
WITH CELL-ADHESIVE PROTEIN ASSEMBLIES** 108  
J.CHLUPAC, E.FILOVA, T.RIEDEL, E.BRYNDA, E.PAMULA,  
V.LISA, L.BACAKOVA

**LIMITING FIBER EXTENSIBILITY MODEL  
FOR ARTERIAL WALL** 112  
L.HORNY, R.ZITNY, H.CHLUP, S.KONVICKOVA

**AN ULTRASONIC METHOD FOR ESTIMATION  
OF ELASTIC PROPERTIES OF R-BONE  
CEMENT AFTER IMMERSION IN RINGER'S  
SOLUTION** 113  
I.RAJZER, J.PIEKARCZYK, O.CASTANO, E.ENGEL,  
J.A.PLANELL

**THE ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR  
SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES  
ON CARBORANETHIOL-MODIFIED GOLD FILMS** 117  
M.PARIZEK, T.BASE, M.G.S.LONDESBOROUGH, V.LISA,  
L.BACAKOVA

**BIOMATERIALS WITH ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY** 119  
K.WYSOCKA, I.BUZALEWICZ, A.WIELICZKO, K.KOWAL,  
W.STRĘK, H.PODBIELSKA

**COMPARATIVE STUDY OF HYDROXYAPATITE  
AND HYDROXYAPATITE MIXED WITH BIOGLASS  
COATINGS OF METALLIC IMPLANTS,  
DEPOSITED BY PLD METHOD** 121  
W.MRÓZ, M.JEDYŃSKI, S.BURDYŃSKA, A.PROKOPIUK,  
A.ŚLÓSARCZYK, E.MENASZEK, A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA,  
M.ŁĄCZKA, K.CHOLEWA-KOWALSKA, A.NIEDZIELSKA

**SILVER BASED NANOMATERIALS-  
FLUORESCENCE ENHANCEMENT IN SILVER  
DOPED SILICA BASED NANOBIMATERIALS** 124  
K.WYSOCKA, U.BINDIG, J.BAUER, W.STRĘK, K.KOWAL,  
H.PODBIELSKA

**THE EFFECT OF TITANIUM ALLOY MODIFIED  
WITH a-C:N:H AND a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) COATINGS  
ON ADHESION AND IMMUNE RESPONSE  
OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG-63 CELLS** 126  
A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, E.MENASZEK,  
E.KOŁACZKOWSKA, M.JANUŚ, B.STYPUŁA

**IN VITRO CELL BIOCOMPATIBILITY  
OF NANOSTRUCTURED THERMOPLASTIC  
ELASTOMERS FOR SOFT TISSUE IMPLANTS** 100  
M.EL FRAY, M.PIĄTEK

**THE EFFECT OF HIGH ENERGY RADIATION  
ON NANOCOMPOSITE-BASED BIOMATERIALS** 104  
M.PIĄTEK, M.EL FRAY, G.PRZYBYTNIK, M.WALO

**ENDOTHELIAL CELLS ON PET VASCULAR  
PROSTHESES IMPREGNATED WITH POLYESTER-  
BASED COPOLYMERS AND COATED  
WITH CELL-ADHESIVE PROTEIN ASSEMBLIES** 108  
J.CHLUPAC, E.FILOVA, T.RIEDEL, E.BRYNDA, E.PAMULA,  
V.LISA, L.BACAKOVA

**LIMITING FIBER EXTENSIBILITY MODEL  
FOR ARTERIAL WALL** 112  
L.HORNY, R.ZITNY, H.CHLUP, S.KONVICKOVA

**AN ULTRASONIC METHOD FOR ESTIMATION  
OF ELASTIC PROPERTIES OF R-BONE  
CEMENT AFTER IMMERSION IN RINGER'S  
SOLUTION** 113  
I.RAJZER, J.PIEKARCZYK, O.CASTANO, E.ENGEL,  
J.A.PLANELL

**THE ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR  
SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES  
ON CARBORANETHIOL-MODIFIED GOLD FILMS** 117  
M.PARIZEK, T.BASE, M.G.S.LONDESBOROUGH, V.LISA,  
L.BACAKOVA

**BIOMATERIALS WITH ANTIBACTERIAL  
ACTIVITY** 119  
K.WYSOCKA, I.BUZALEWICZ, A.WIELICZKO, K.KOWAL,  
W.STRĘK, H.PODBIELSKA

**COMPARATIVE STUDY OF HYDROXYAPATITE  
AND HYDROXYAPATITE MIXED WITH BIOGLASS  
COATINGS OF METALLIC IMPLANTS,  
DEPOSITED BY PLD METHOD** 121  
W.MRÓZ, M.JEDYŃSKI, S.BURDYŃSKA, A.PROKOPIUK,  
A.ŚLÓSARCZYK, E.MENASZEK, A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA,  
M.ŁĄCZKA, K.CHOLEWA-KOWALSKA, A.NIEDZIELSKA

**SILVER BASED NANOMATERIALS-  
FLUORESCENCE ENHANCEMENT IN SILVER  
DOPED SILICA BASED NANOBIMATERIALS** 124  
K.WYSOCKA, U.BINDIG, J.BAUER, W.STRĘK, K.KOWAL,  
H.PODBIELSKA

**THE EFFECT OF TITANIUM ALLOY MODIFIED  
WITH a-C:N:H AND a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) COATINGS  
ON ADHESION AND IMMUNE RESPONSE  
OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG-63 CELLS** 126  
A.ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA, E.MENASZEK,  
E.KOŁACZKOWSKA, M.JANUŚ, B.STYPUŁA

# OCENA WPŁYWU MIKRO- STRUKTURY ŁAŃCUCHA KOPOLIMEROWEGO NA KINETYKĘ UWALNIANIA CYKLOSPORYNY A (CyA) I RAPAMYCYN Z MATRYC WYKONANYCH Z POLI(L- LAKTYDO-KO-GLIKOLIDU)

KATARZYNA JELONEK<sup>1,2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, BOŻENA JARZĄBEK<sup>2</sup>  
KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JOANNA JAWORSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
<sup>2</sup> POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 1-4]*

## Wstęp

Alifatyczne poliestry należą do grupy materiałów, umożliwiających tworzenie różnorodnych implantowanych i przeznaczonych do iniekcji systemów dla kontrolowanego uwalniania czynników terapeutycznych [1]. Jednakże szybki postęp w projektowaniu i stosowaniu nowych nośników leków wymusza konieczność syntezy poliestrów o pożądanym właściwościach fizycznych i mechanicznych. Oprócz makrostruktury, istotny jest również dobór kopolimerów, charakteryzujących się odpowiednią mikrostrukturą łańcuchów polimerowych, gdyż wpływa ona bezpośrednio na właściwości fizyczne, termiczne, mechaniczne oraz biodegradowalność [2]. Kopolimeryzacja glikolidu i laktydu jest szeroko wykorzystana do modyfikowania właściwości polilaktydu i poliglikolidu. Kopolimer, zawierający 25-70% jednostek glikolidylowych (GA) jest amorficzny, a wzrost udziału frakcji amorficznej wpływa na stabilizację procesu uwalniania leku, co stwierdzono w wielu systemach transportu leków. Ponadto, wraz ze wzrostem jednostek glikolidylowych, w polimerze wzrasta jego hydrofilowość [3]. Kopolimery glikolidu z laktydem znajdują zastosowanie w produkcji implantów (Zoladex®), matryc polimerowych in situ (Eligard®), czy mikroczałstek (Lupron Depot®) [4]. Opisano również próby tworzenia z nich nośników cyklosporyny A i rapamycyny, w celu wyeliminowania licznych działań niepożądanych, które wykazują dostępne, konwencjonalne postaci tych leków [5,6].

W niniejszej pracy analizowano wpływ mikrostruktury łańcucha kopolimerowego na kinetykę uwalniania cyklosporyny A i rapamycyny z matryc wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) o takim samym wzajemnym stosunku komonomerów, lecz różniących się mikrostrukturą łańcucha kopolimerowego i masą cząsteczkową.

## Materiały i metody

Trzy rodzaje poli(L-laktydo-ko-glikolidu): 85:15 (R=0,41; Mn=63kDa); 85:15 (R=0,37; Mn=41,2kDa) oraz 85:15(68% PEG) (Mn=23kDa) (TABELA 1), zastosowano do tworzenia matryc z 10% zawartością cyklosporyny A lub rapamycyny (sirolimusu) (LC laboratories). W badaniach użyto kopolimeru

# THE INFLUENCE OF COPOLYMER CHAIN MICROSTRUCTURE ON CYCLOSPORINE A (CyA) AND RAPAMYCINE RELEASE FROM MATRICES OBTAINED FROM POLY(L-LACTIDE-CO-GLYCOLIDE)

KATARZYNA JELONEK<sup>1,2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>,  
PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>, BOŻENA JARZĄBEK<sup>2</sup>  
KATARZYNA GĘBAROWSKA<sup>2</sup>, JOANNA JAWORSKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
<sup>2</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCE  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 1-4]*

## Introduction

Aliphatic polyesters belong to large group of materials, that may be used for producing various implantable and injectable systems for controlled drug release [1]. However, there is the necessity for new polyesters development with particular physical and mechanical features, because of dynamic progress in designing and application of novel drug carriers. Apart from macrostructure, selecting of copolymers with appropriate microstructure is also important, because it influences directly physical, thermal, mechanical features and biodegradability [2]. Copolymerization of glycolide and lactide is widely used to modify features of polylactide and polyglycolide. Copolymer, containing 25-70% of glycolidyl units (GA) is amorphous, and increase of amorphous fraction causes stabilisation of drug release process, which was observed in many drug delivery systems [3]. Moreover, along with increase of glycolidyl units, hydrophilicity increases. Copolymers of glycolide and lactide are used in making implants (Zoladex®), in situ matrices (Eligard®), or microparticles (Lupron Depot®) [4]. Attempts of developing carriers for cyclosporine and rapamycine were noted, as a way of elimination of many side effects that characterizes available conventional drug dosages [5,6].

In presented study, the influence of copolymeric chain microstructure to kinetics of cyclosporine A and rapamycine release from poly(L-lactide-co-glycolide) matrices made of the same comonomer ratio but different chain microstructure and molecular weight.

## Material and methods

Three kinds of poly(L-lactide-co-glycolide): 85:15 (R=0,41; Mn=63kDa); 85:15 (R=0,37; Mn=41,2kDa) and 85:15(68% PEG) (Mn=23kDa) were used to prepare matrices with 10 weight-% of one of two studied drugs: CyA or rapamycine (sirolimus) (LC laboratories) (TABLE 1). Copolymers were synthesized in Centre of Polymeric and Carbon Materials of PAN in Zabrze, with using Zr(acac)<sub>4</sub> as non toxic initiator of copolymerization reaction. The characteristic of copolymers microstructure during the degradation process was conducted based on the parameters determined from <sup>1</sup>H NMR spectra: the percentage content of copolymer units, the average length of the blocks, randomization and transesterification of the second mode ratio, according to



mery zeszytezywane w Centrum Materiałowy Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze, przy zastosowaniu  $Zr(acac)_4$  jako nietoksykznego inicjatora. Mikrostrukturę łańcuchowy kopolimerowych podczas procesu degradacji określano przy pomocy parametrów wyznaczanych z widm  $^1H$  NMR: procentowego udziału jednostek kopolimerowych, średniej długości bloków, współczynnika bezładności i transestryfikacji drugiego stopnia, według równań przedstawionych w literaturze [7]. Widma protonowe wykonano przy użyciu spektrometru o wysokiej rozdzielczości (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz). Jako rozpuszczalnik zastosowano osuszony DMSO-d<sub>6</sub>. Masy cząsteczkowe kopolimerów ( $M_n$ ) oraz polidispersyjność ( $D$ ), wyznaczono przy użyciu chromatografu żelowego Phisics SP 8800, stosując chloroform jako eluent, szybkość przepływu 1 mL/min, kolumny Styragel oraz kalibrację w oparciu o standardy polistyrenowe. Polimerowe filmy o średnicy 1,2 cm przygotowane zostały poprzez rozpuszczenie każdego z kopolimerów w chlorku metylenu, rozpuszczeniu odpowiedniej ilości jednego z badanych leków (CyA lub rapamycyny) (10% ilości użytego polimeru), a następnie zmieszanie obu roztworów. Roztwór wylewano na płytę szklaną i pozostawiono w temperaturze pokojowej do czasu odparowania rozpuszczalnika. Zważone próbki polimerowych filmów umieszczono w szczelnie zamykanych butelkach, zawierających sól fizjologiczną, które inkubowano w 37°C stale mieszając. W regularnych odstępach czasu wymieniano roztwór soli fizjologicznej, a w zebranych próbach oznaczano stężenie leku przy zastosowaniu spektroskopii UV-VIS (Spektrofotometr V-570, UV-VIS – NIR – JASCO). W przypadku cyklosporyny A absorbcję mierzono przy 202 nm, natomiast rapamycyny – 276 nm.

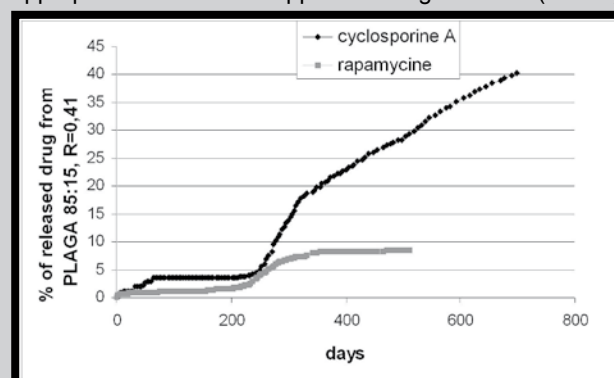
## Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie badań oceniano profil uwalniania CyA i rapamycyny z matryc wykonanych z PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) w celu potwierdzenia odpowiednio długiego czasu degradacji, który jest korzystny w przypadku uwalniania leków immunosupresyjnych (RYS. 1). Zaobserwowano uwalnianie CyA z pewnym opóźnieniem, po wystąpieniu fazy zahamowania uwalniania, ilość uwolnionego leku była zatem w ciągu 246 dni bardzo niewielka, następnie ulegała stopniowemu wzrostowi i po niemal dwóch latach (698 dni) wynosiła 40,4%. Podobną fazę początkowego zahamowania uwalniania, zanotowano w przypadku matryc wykonanych z tego samego kopolimeru, zawierających rapamycynę (tylko 2,22% przez 227 dni), następnie okres uwalniania leku na bardzo niskim poziomie (w ciągu 512 dni z matrycy ubyło jedynie 8,4% leku). Okresy opóźnienia procesu uwalniania leku z matryc polimerowych, tzw. „lag time”, zostały zaobserwowane w badaniach nad uwalnianiem idarubicyny i doksorubicyny z PLAGA. Podczas, gdy dla idarubicyny wykazano równomierny profil uwalniania od początku doświadczenia, dla doksorubicyny jego przebieg charakteryzował się dużym spowolnieniem przez pierwsze dziewiętnaście dni, wynikającym z oddziaływań między grupą hydroksylową doksorubicyny i grupą karbonylową polilaktidu [8]. Podobne wyniki opublikowano dla mikrosfer, wykonanych z PLAGA (75:25), z których CyA uwalniała się na bardzo niskim poziomie przez okres 4 tygodni, po wstępnym okresie zahamowania uwalniania, trwającym 3 tygodnie. Równomierne uwalnianie leku zaobserwowano natomiast dla mikrosfer, wykonanych z PLA. Różnice w profilu uwalniania CyA z mikrosfer wykonanych z PLA i PLAGA próbowano wyjaśnić, w oparciu o różnice w krystaliczności obu materiałów. W przypadku mikrosfer, wykonanych z krystalicznego PLA, powstawać mogły mikrokanaly, które funkcjonują jako przestrzeń dla penetracji wody [5].

the equations presented in literature [7]. The proton NMR spectra of copolymers were recorded on high resolution spectrometr (AVANCE II Ultra Shield Plus, Bruker 600 MHz). DMSO-d<sub>6</sub> was used as a solvent. The molecular weight was determined by GPC (Physics SP 8800 chromatograph), with chloroform as eluent. The 1,2 cm diameter films were prepared from solution of each kind of copolymer in methylene chloride, solution of the appropriate amount of drug (CyA or rapamycine) (10 wt% of used copolymeric material) and mixing the two solutions. The solution was cast by means of a standard casting device on a glass plate, evaporated at ambient temperature and dried under reduced pressure. The weighted polymeric matrices were placed in well closed vials with physiological saline. The vials were incubated at 37°C and constantly shaken. Systematically, the physiological saline was replaced and drug concentration was determined in collected samples by means of UV-vis spectroscopy (Spectrophotometer V-570, UV-VIS-NIR-JASCO). For CyA, the absorbance was measured at 202 nm and for rapamycine at 276 nm.

## Results and discussion

In the first stage of experiment, release profile of CyA and rapamycine from PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) matrices was analyzed to confirm enough slow degradation process, appropriate for immunosuppressive drugs release (FIG. 1).



**RYS. 1.** Procentowa ilość uwolnionych leków immunosupresyjnych z matrycy wykonanej z PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) w czasie 698 dni (cyklosporyna A) i 512 dni (rapamycyna).

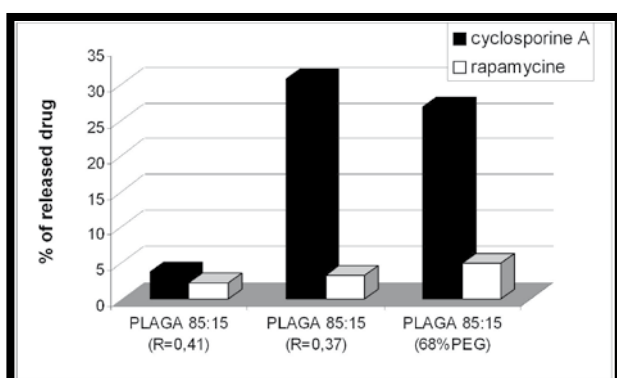
**FIG. 1.** Cumulative release profile from PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ) of cyclosporine A during 689 days and rapamycine during 512 days.

Lag time in CyA release was observed, so the amount of released drug during 246 days was very low, then it was gradually rising to reach 40,4% after almost 2 years (698 days). Similarly, initial inhibition of drug release was noted also for matrices made of the same kind of copolymer, containing rapamycine (only 2,22% during 227 days), followed by period of very low level of released drug (during 512 days only 8,4% of rapamycine was released). Lag time in drug release profile was also observed in studies on idarubicin and doxorubicin release from PLAGA. Even release of idarubicin from the beginning of the experiment was determined, but very slow until ninetieth day in case of doxorubicin, where structural interactions between hydroxyl group of idarubicin and carbonyl group of polylactide were confirmed [8]. Similar results were published for PLAGA (75:25) microspheres, from which CyA had long lag time of 3 weeks, and throughout 4 weeks, the released amount of this drug was undesirable low. In case of PLA microspheres, even CyA release was observed.

**TABELA 1.** Mikrostruktura matryc, wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu), zawierających cyclosporynę A lub rapamycynę ( $M_n$  - liczbowo średni ciężar cząsteczkowy;  $l_{LL}$ ,  $l_{GG}$  - średnia długość jednostek laktydylowych i glikolidylowych;  $R$  - współczynnik bezładności;  $T_{II}$  - współczynnik transestryfikacji drugiego stopnia,  $I/M$  - stosunek ilości inicjatora do monomeru).

**TABLE 1.** Microstructure of poly(L-lactide-co-glycolide) matrices, containing cyclosporine A or rapamycine ( $M_n$  - number-average molecular weight;  $l_{LL}$ ,  $l_{GG}$  - the average length of lactidyl and glycolidyl sequences;  $R$  - randomization ratio;  $T_{II}$  - transesterification of the second mode ratio;  $I/M$  - initiator to monomer ratio).

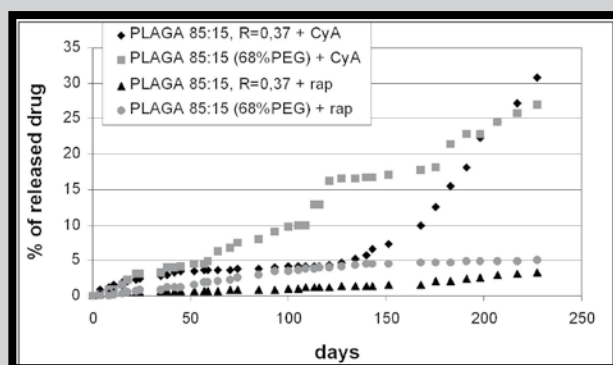
Rodzaj polimeru Kind of copolymer	$M_n$ ( $D_a$ )	The average length of sequences	$R$	$T_{II}$	Copolymerization conditions	
					$I/M$	Temp.
poly(L-lactide-co-glycolide) (85:15)	63 000	$l_{LL} = 9,24$ $l_{GG} = 1,65$	0,41	0,2	1/800	110°C
poly(L-lactide-co-glycolide) (85:15)	41 200	$l_{LL} = 8,65$ $l_{GG} = 1,9$	0,37	0,18	1/1000	120°C
poly(L-lactide-co-glycolide):PEG (85:15):68% PEG	23 000	$l_{LL} = 6,73$ $l_{GG} = 1,2$	0,55	0,55	1/600	120°C



**RYS. 2.** Procentowa ilość uwolnionej cyclosporyny A i rapamycyny z matryc wykonanych z poli(L-laktydo-ko-glikolidu) w ciągu 227 dni.

**FIG. 2.** The amount of released cyclosporine A and rapamycine from matrices obtained from poly(L-lactide-co-glycolide) during 227 days.

W drugim etapie porównano profil uwalniania z trzech matryc, wykonanych z PLAGA o różnej mikrostrukturze łańcucha (RYS. 2 i 3, TABELA 1). W ciągu 227 dni najwięcej CyA uwolnionej zostało z PLAGA 85:15;  $R=0,37$  (30,9%), nieco mniej z kopolimeru z 68% zawartością glikolu polietylenowego (PEG) - PLAGA 85:15 (68% PEG) (26,9%), natomiast jedynie niewielka ilość z PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . Największa ilość rapamycyny uwolniona została z PLAGA 85:15 (68% PEG) (5%). Zaobserwowano różnice w ilości i sposobie uwalniania badanych leków z matryc, wykonanych z PLAGA 85:15;  $R=0,41$  oraz PLAGA 85:15;  $R=0,37$ . Wyraźnie większą ilość uwolnionego leku zaobserwowano dla matryc wykonanych z kopolimeru o niższej masie cząsteczkowej, syntezowanych w wyższej temperaturze (120°C), mogącej wpływać na wzmocnione procesy transestryfikacyjne i powstawanie większej ilości krótszych sekwencji statystycznych w łańcuchach kopolimerowych, wpływających na bardziej równomierny przebieg degradacji i procesu uwalniania leku. Na przyspieszenie uwalniania leku wpłynął również dodatek PEG. Wyraźnie większe ilości obydwu badanych leków uwolnione zostały z PLAGA 85:15 (68% PEG) w porównaniu z PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . Wyniki te są zgodne z obserwacjami, iż im bardziej amorficzny kopolimer, większa zawartość jednostek glikolidylowych, niższa masa cząsteczkowa i bardziej hydrofilowy polimer, tym szybciej i gwałtowniej zachodzi proces degradacji [9].



**RYS. 3.** Procentowa ilość uwolnionej cyclosporyny A i rapamycyny z matrycy wykonanej z PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ ) oraz PLAGA 85:15 (68% PEG) w czasie 227 dni.

**FIG. 3.** Cumulative release profile of cyclosporine A and rapamycine from PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ ) and PLAGA 85:15 (68% PEG) during 227 days.

Differences in release profile from PLA and PLAGA microspheres were explained as a result of differences in crystallinity of the materials. In microspheres made from crystalline PLA, microtubes may have been formed during degradation process, that act as a space for water penetration [5].

In the second stage, release profile from three kinds of matrices obtained from PLAGA with different chain microstructure were compared (FIGs. 2 i 3, TABLE 1). During 227 days, the most of CyA was released from PLAGA 85:15;  $R=0,37$  (30,9%), a bit less from copolymer containing 68% of polyethylene glycol (PEG) - PLAGA 85:15 (68% PEG) (26,9%), and only small amount from PLAGA 85:15;  $R=0,41$ . The highest amount of rapamycine was released from PLAGA 85:15 (68% PEG) (5%). Differences in amount and release profile of the studied drugs from PLAGA 85:15;  $R=0,41$  and PLAGA 85:15;  $R=0,37$  matrices were determined. Significantly higher amount of released drug was observed for matrices obtained from copolymer with lower molecular weight, synthesized in higher temperature (120°C), which may cause intensification of transesterification processes and forming higher amount of short random sequences in copolymer chain, allowing more regular degradation and drug release profile. Addition of PEG also influenced acceleration of drug release. Significantly higher amount of the analyzed drugs were released from PLAGA 85:15 (68% PEG) than PLAGA 85:15 ( $R=0,41$ ).

## Wnioski

Stwierdzono odmienny przebieg uwalniania CyA i rapamycyny z matryc, wykonanych z trzech rodzajów PLAGA, różnych pod względem mikrostruktury łańcuchów kopolimerowych. Najwolniejszy przebieg uwalniania cyklosporyny A i rapamycyny zaobserwowano dla kopolimeru o najwyższej masie cząsteczkowej i najdłuższych średnich długościach sekwencji laktydylowych, mogących tworzyć krystaliczne regiony homopolilaktydylowe, których obecność może spowalniać proces degradacji. Okresy zahamowania uwalniania leku, zaobserwowane w większości badanych matryc (z wyjątkiem PLAGA 85:15 ( $R=0,37$ )), wynikać mogą z oddziaływań pomiędzy matrycą kopolimerową a cząsteczką leku. Oddziaływanie cząsteczki leku z łańcuchem polimerowym wpływa na znaczne spowolnienie procesu degradacji matrycy polimerowej z lekiem.

## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW (Nr N518 007 31/0433 i NN 405 3201 33) oraz w ramach badań statutowych SUM (NN-1-040/07).

It was observed, that the more amorphous copolymer, the highest glycolidyl units content and the most hydrophilic polymer, the faster and more rapid degradation process [9].

## Conclusions

Different CyA and rapamycine release profile from matrices obtained from three kinds of PLAGA 85:15, dependent on copolymer chain microstructure was determined. The slowest release process of CyA and rapamycine was observed for copolymer with the highest molecular weight and the longest the average length of the lactidyl blocks, that may form crystalline homopolilactidyl regions and delay degradation process. Inhibition of drug release, observed for most of studied matrices (except from PLAGA 85:15;  $R=0,37$ ), may result from interactions between copolymeric matrix and drug molecule. Interaction of drug molecule with copolymer chain influences significantly slower degradation process of polymeric matrix with drug.

## Acknowledgements

This study has been financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N518 007 31/0433 and NN 405 3201 33) and Medical University of Silesia (Grant No: NN-1-040/07).

## Piśmiennictwo

- [1] Li S, Vert M. Biodegradable polymers: Polyester. [In:] Mathiowitz E, ed. The Encyclopedia of Controlled Drug Delivery. New York: John Wiley & Sons 1999: pp. 71-91.
- [2] Kasperczyk J., Bero M.. Coordination polymerization of lactides, 2a. Microstructure determination of poly[(L,L-lactide)-co-( $\epsilon$ -caprolactone)] with  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. Macromolecular Chemistry 1991; 192: 1777-1787.
- [3] Stridsberg KM, Ryner M, Albertsson ACh. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designer Macromolecular Architecture. [In:] Albertsson AC, ed. Degradable Aliphatic Polyesters. Berlin: Springer; 2002: pp. 40-67.
- [4] Mcleod DG. Hormonal therapy: Historical perspective to future directions. Urology 2003; 61 (Suppl 2A): 3-7.
- [5] Utrata T, Arimori K, Nakano M. Modification of release rates of cyclosporin A from poly(L-lactic acid) by fatty acid esters and in vivo evaluation of the microspheres. Journal of Controlled Release 1999; 58: 133-141.

## References

- [6] Alexis F, Venkatraman SS, Rath SK, Boey F. In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug – incorporated biodegradable stent matrices. Journal of Controlled Release 2004; 98: 67-74.
- [7] Kasperczyk J. Microstructural analysis of poly[(L,L-lactide)-co-(glycolide)] by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  n.m.r. spectroscopy. Polymer 1996; 37 (2): 201-203.
- [8] Stokłosa K, Kasperczyk J, Dobrzyński P, Kaczmarczyk B. Various release profile of anthracyclines as a result of interactions between drug and biodegradable polymer matrix. Inżynieria Biomateriałów 2005; 6: 203-206.
- [9] Jaiswal J, Gupta SK, Kreuter J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation process. Journal of Controlled Release 2004; 96: 169-178.

# OCENA BIOZGODNOŚCI BIORESORBOWALNYCH MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH WOBEC LUDZKICH FIBROBLASTÓW

ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>2</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
JOANNA ORCHEL<sup>3</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI,  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
<sup>2</sup> POLSKA AKADEMIA NAUK,  
CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH,  
UL. M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA  
<sup>3</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY,  
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 5-8]*

## Wstęp

Rozwój inżynierii tkankowej związany jest z rosnącym zapotrzebowaniem na nowe, biozgodne, resorbowalne materiały, przeznaczone do wytwarzania trójwymiarowych podłoży dla komórek, umożliwiających odtworzenie prawidłowej struktury przestrzennej regenerującej się tkanki. Do najbardziej perspektywicznych biomateriałów, z punktu widzenia medycyny regeneracyjnej, należą syntetyczne polimery z grupy poliestrów alifatycznych [1]. Kopolimery glikolidu, laktydu, ε-kaprolaktonu oraz trimetylenowęglanu (TMC) są szeroko badane pod kątem ich wykorzystania do konstrukcji rusztowań dla adherentnych komórek. Jednakże pewne wątpliwości co do pełnej biozgodności tego rodzaju materiałów budzi możliwość obecności w ich strukturze domieszek poreakcyjnych (rozpuszczalniki, sole metali) [2,3,4]. Tradycyjne metody syntezy tych biomateriałów wykorzystują toksyczne związki cyny jako inicjatory procesu polimeryzacji. Całkowita eliminacja tych związków z polimeru jest praktycznie niemożliwa, co skutkuje ich powolnym przenikaniem do krwi. Z tego względu dąży się do zastąpienia związków cyny bardziej biozgodnymi inicjatorami polimeryzacji, takimi jak związki cyrkonu, cynku, wapnia lub żelaza [2,3,5,6].

Celem pracy była ocena procesów adhezji oraz wzrostu ludzkich fibroblastów na powierzchni szeregu biodegradowalnych materiałów polimerowych różniących się składem chemicznym, strukturą łańcucha i masą cząsteczkową. Badanymi materiałami były kopolimery glikolidu, laktydu, ε-kaprolaktonu oraz TMC, otrzymane z wykorzystaniem acetyloacetonianu cyrkonu ( $Zr(Acac)_4$ ), jako inicjatora polimeryzacji.

## Materiały i metody

Wszystkie materiały polimerowe wykorzystane w badaniach (TABELA 1) otrzymano na podstawie wcześniej opisanym procedur ich syntezy [6]. Kopolimeryzację prowadzono w masie, w atmosferze argonu, umieszczając komonomery z  $Zr(Acac)_4$  w szczelnie zamkniętych szklanych ampułach. Ampuły umieszczono w łaźni olejowej o temp. 120°C, zaopatrzonej w mieszadło.

Masę cząsteczkową (Mn) oraz polidispersję (D) wyznaczono za pomocą chromatografii żelowej przy użyciu chromatografu Physics SP 8800. Widma H-1 (600MHz)

# BIOCOMPATIBILITY OF BIODEGRADABLE SYNTHETIC POLYMERS FOR HUMAN FIBROBLASTS

ARKADIUSZ ORCHEL<sup>1</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>2</sup>,  
JANUSZ KASPERCZYK<sup>1,2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>2</sup>,  
JOANNA ORCHEL<sup>3</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCE  
CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS,  
34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

<sup>3</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,  
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY,  
1, NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 5-8]*

## Introduction

The development of tissue engineering depends strongly upon designing of novel, biocompatible, resorbable materials suitable to fabrication of scaffolds needed to guide tissue regeneration in three dimensions. Biodegradable synthetic polymers as aliphatic polyesters seem to be the most promising biomaterials for tissue engineering [1]. Copolymers of glycolide, lactide, ε-caprolactone and trimethylene carbonate (TMC) are commonly used for scaffold fabrication [1,2]. However, traditional methods of their synthesis employ highly toxic tin compounds as initiators of polymerization. Complete elimination of these compounds from the biomaterials is practically impossible which results in their slow penetration into patients blood circulation system [2,3,4]. Therefore, several attempts were recently made to replace tin-based initiators with more biocompatible compounds of zirconium, zinc, calcium or iron [2,3,5,6].

The aim of our study was to examine adhesion and growth of human fibroblasts on a set of novel biodegradable copolymers of L-lactide, glycolide, ε-caprolactone and trimethylene carbonate. The synthesis of the materials was carried out with the use of nontoxic zirconium acetylacetonate as an initiator of polymerization.

## Materials and methods

All of the polymeric materials (TABLE 1) were obtained on the basis of copolymerization procedures described earlier [6]. Briefly, copolymerizations were conducted in bulk in argon atmosphere, comonomers with the  $Zr(Acac)_4$  as initiator were charged into glass ampoules and sealed. The ampoules were conditioned in an oil bath equipped with shaker at 120°C.

Molecular weights (Mn) and polydispersity (D) of the copolymers were determined by gel permeation chromatography with a Physics SP 8800 chromatograph. The H-1 (600MHz) and C-13 (125MHz) NMR spectra of the copolymers were recorded with a Bruker 600MHz AVANCE II Ultra Shield Plus. Dried DMSO-d<sub>6</sub> or CDCl<sub>3</sub> were used as a solvent. The proton spectra were obtained with a 3.74-s acquisition time, 7μs pulse width and 4.7s delay time between pulses and the carbon spectra with 1.8s the acquisition time, 9μs pulse width, the delay between pulses 3s.

The obtained copolymers were dissolved in 1,1,1,3,3,3-HFIP (Fluka) to obtain polymer solutions with the same

**TABELA 1. Charakterystyka mikrostruktury badanych kopolimerów.****TABLE 1. Microstructure characteristic of the studied copolymers.**

No	Kind of copolymer	Mn	D	The average length of blocks	R	T <sub>II</sub>
1	92% ε-caprolactone / 8% glycolide	63000	2.1	$L_{GG} = 0.72$ $L_{Cap} = 4.1$	1.6	1,07
2	85% L-lactide / 15% glycolide	75600	2.0	$L_{LL} = 9.24$ $L_{GG} = 1.63$	0.41	0.2
3	75% L-lactide / 25% ε-caprolactone	60300	2.1	$L_{LL} = 7.8$ $L_{Cap} = 2.6$	0.45	-
4	70% L-lactide / 30% TMC	36000	2.6	$L_{LL} = 6.28$ $L_T = 2.44$	0.5	2.78
5	70% TMC / 30% L-lactide	17500	2.0	$L_T = 4.11$ $L_{LL} = 1.52$	0.57	0.63
6	30% caprolactone / 70% TMC	31500	2,1	$L_{cap} = 4.23$ $L_T = 3.86$	0,5	-
7	30% glycolide / 70% TMC	6000	1.5	$L_{GG} = 2.9$ $L_T = 7.64$	0.3	-

i C-13 (125MHz) NMR kopolimerów wykonano na spektrometrze Bruker 600 MHz AVANCE II Ultra Shield Plus. Jako rozpuszczalnik zastosowano osuszony DMSO-d<sub>6</sub> lub CDCl<sub>3</sub>. Widma protonowe otrzymano przy czasie akwizycji 3.74sek., szerokości impulsu PW=7μs, i 4.7sek. odstępem między impulsami, natomiast widma węglowe z czasem akwizycji 1.8sek., szerokością impulsu PW=9 μs i odstępem między impulsami 3sek.

Otrzymane kopolimery rozpuszczano w 1,1,1,3,3,3-HFIP (1,1,1,3,3,3-Heksafluoro-2-propanol; Fluka) uzyskując roztwory o jednakowej lepkości, które następnie wprowadzano do studzienek mikropyłek testowych do hodowli komórkowej. Mikropyłki te suszono, najpierw na powietrzu a następnie w próżni w celu całkowitego usunięcia rozpuszczalnika. Następnie płytki sterylizowano promieniowaniem γ.

Badania prowadzono na siedmiu materiałach polimerowych: 1) 92:8 poli(ε-kaprolaktono-ko-glikolid) (PCL92%-PGA8%, Mn=63.000Da); 2) 85:15 poli(L-laktydo-ko-glikolid) (L-PLA85%-PGA15%, Mn=75.600Da); 3) 75:25 poli(L-laktydo-ko-ε-kaprolakton) (L-PLA 75% - PCL25%, Mn = 60.300Da); 4) 70:30 poli(L-laktydo-ko-trimetylenowęglan) (L-PLA70%-TMC30%, Mn=36.000Da); 5) 30:70 poli(L-laktydo-ko-trimetylenowęglan) (L-PLA30%-TMC70%, Mn=17.500Da); 6) 30:70 poli(ε-kaprolaktono-ko-trimetylenowęglan) (PCL30%-TMC70%, Mn=31.500); 7) 30:70 poli(glikolido-ko-trimetylenowęglan) (PGA 30%-TMC70%, Mn=6.000Da). Ich mikrostrukturę, przedstawioną w TABELI 1, scharakteryzowano na podstawie parametrów wyznaczonych z widm <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR, takich jak: średnia długość laktydylowych, glikolidylowych, kaproilowych i węglanowych (odpowiednio - L<sub>LL</sub>, L<sub>GG</sub>, L<sub>Cap</sub>, L<sub>T</sub>) bloków, procentowa zawartość jednostek glikolidylowych (F<sub>GG</sub>) lub laktydylowych (F<sub>LL</sub>); współczynnik randomizacji (R) lub transestryfikacji (T<sub>II</sub>).

Ludzkie dziąsłowe fibroblasty HGF-1 (ATCC-LGC Promochem) hodowano w pożywce MEM (Minimum Essential Medium, Sigma) zawierającej 10% bydziejcej surowicy płodowej, 100U/ml penicyliny, 100μg/ml streptomycyny, 1× MEM-Non Essential Amino Acids i 10 mM HEPES. Hodowlę prowadzono w temp. 37°C, w atmosferze o składzie 95% powietrze/5% CO<sub>2</sub>. Do oceny adhezji i wzrostu komórek wykorzystano test "In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B Based" (Sigma). Podstawowym składnikiem tego testu jest barwnik Sulforodamina B, który wiąże się z białkami komórkowymi. Po wybarwieniu komórek i rozpuszczeniu związanego w ich wnętrzu barwnika dokonywano pomiaru absorbancji przy długości fali λ=565nm oraz λ=690nm

viscosity and used as the polymeric film coating the 96-well plates. Then the culture plates were dried under the air atmosphere and under reduced pressure to remove solvent completely and sterilized with exposure to γ-irradiation.

Different kinds of biodegradable copolymers have been selected to examine their influence on human chondrocytes growth: 1) 92:8 poly(ε-caprolactone-co-glycolide) (PCL92%-PGA8%, Mn=63.000); 2) 85:15 poly(L-lactide-co-glycolide)(L-PLA85%-PGA15%, Mn=75.600); 3) 75:25 poly(L-lactide-co-ε-caprolactone)(L-PLA75%-PCL25%, Mn=60.300); 4) 70:30 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate) (L-PLA70%-TMC30%, Mn=36.000); 5) 30:70 poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate)(L-PLA30%-TMC70%, Mn=17.500); 6) 30:70 poly(ε-caprolactone-co-trimethylene carbonate) (PCL30%-TMC70%, Mn=31.500); 7) 30:70 poly(glycolide-co-trimethylene carbonate)(PGA30%-TMC70%, Mn=6000). Their characteristic, conducted on the basis on the parameters determined from <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra as the average length of the lactidyl, glycolidyl, caproyl, carbonate (L<sub>LL</sub>, L<sub>GG</sub>, L<sub>Cap</sub>, L<sub>T</sub>, respectively) blocks; the percentage content of glycolide (F<sub>GG</sub>) or lactide (F<sub>LL</sub>); randomization (R) or transesterification (T<sub>II</sub>) ratio, is presented in TABLE 1.

Human gingival HGF-1 fibroblasts (ATCC-LGC Promochem) were cultured at 37°C in 5%CO<sub>2</sub>, in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/ml penicillin and 100μg/ml streptomycin, 1× MEM-Non Essential Amino Acids and 10mM HEPES buffer. Cell adhesion and proliferation were quantitated using "In Vitro Toxicology Assay Kit, Sulforhodamine B Based" (Sigma). The Sulforhodamine B is a dye staining cellular proteins. After the liberation of the incorporated dye absorbance was measured at λ=565nm and λ=690 nm (reference wavelength). To study the cell adhesion, fibroblasts were plated at 10<sup>4</sup> cells per well in 200μl of culture medium in 96-well plates. Subsequently, plates were incubated under normal culture conditions for 1 and 4 hours. At the end of incubation, cells were washed with PBS, fixed with TCA and then the assay was performed. To study the cell proliferation, fibroblasts were plated at 5×10<sup>3</sup> cells per well in 200μl of culture medium and cultured for 4 days. The loss of cell membrane integrity was determined using "In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactate Dehydrogenase Based" (Sigma) according to the manufacturer's instruction.

## Results and discussion

It has been previously shown that polymeric materials synthesized with the use of Zr(Acac)<sub>4</sub> displayed appropriate mechanical properties and degradation rate. Copolymers of L-lactide, glycolide, ε-caprolactone produced with the use of Zr(Acac)<sub>4</sub> appeared to promote the growth and viability of osteoblasts, fibroblasts and monocyte-like cells [7,8,9]. As shown in FIG. 1, on polymeric films fibroblasts attached more slowly compared to control. After 1h of incubation cell number was comparable to that seen in control cultures exclusively on L-PLA30%-TMC70%. However, after 4h of incubation the fibroblasts adhered to the majority of polymer films as well as they adhered to the control plastic substrate. The number of adherent cells was significantly decreased on solely one polymeric material: PGA30%-TMC70%.

Generally the proliferation rate of fibroblasts growing on polymer films was similar to control value. Significant inhibition of the growth was observed on two materials: PCL 30%-TMC 70% and PGA30%-TMC70% (FIG. 2A). Loss of cell membrane integrity was observed in the cells cultured on PGA30%-TMC70% (FIG. 2B).

Generally, it should be concluded that majority of the studied copolymers are well-tolerated and appropriate for growth of human connective tissue cells.

(długość referencyjna). Badając adhezję, do studzienek mikroptytki wprowadzano po  $10^4$  komórek w 200 $\mu$ l pożywki, a następnie płytki inkubowano w inkubatorze CO<sub>2</sub> przez jedną oraz cztery godziny. Następnie studzienki płukano PBS, komórki utrwalano w TCA, po czym wykonywano oznaczenie. Dla oceny szybkości proliferacji fibroblastów na powierzchni badanych materiałów do poszczególnych studzienek mikroptytki wprowadzano po  $5 \times 10^3$  komórek zawieszonych w 200 $\mu$ l pożywki. Komórki te hodowano na powierzchni badanych materiałów 4 doby po czym postępowano z nimi w sposób opisany powyżej. Integralność błon komórkowych badano przy pomocy testu „In Vitro Toxicology Assay Kit, Lactate Dehydrogenase Based” (Sigma) zgodnie z instrukcją producenta.

## Wyniki i dyskusja

Wykazano, że materiały polimerowe takie jak polilaktydy, poliglikolid i poli- $\epsilon$ -kaprolakton syntetyzowane przy pomocy Zr(Acac)<sub>4</sub> charakteryzują się, z punktu widzenia inżynierii tkankowej, odpowiednimi właściwościami mechanicznymi oraz szybkością degradacji. Stwierdzono, że na powierzchni kopolimerów L-laktydu, glikolidu i  $\epsilon$ -kaprolaktonu możliwy był wzrost osteoblastów, fibroblastów i monocytów, przy czym nie obserwowano cytotoksycznego działania powyższych podłoży na te komórki [7,8,9].

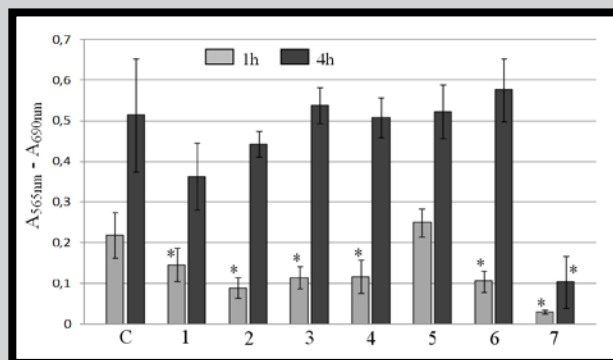
Jak pokazano na RYS. 1, fibroblasty na większości badanych materiałów zakotwiczały się nieco wolniej niż na standardowym polistyrenowym podłożu, gdyż po 1 godzinie inkubacji jedynie liczba komórek na powierzchni L-PLA 30% - TMC 70% nie różniła się od kontroli. Jednakże po 4 godzinach jedynie na powierzchni kopolimeru PGA 30% - TMC 70% liczba komórek była istotnie mniejsza niż w kontroli.

Fibroblasty HGF-1 proliferowały na powierzchni większości badanych materiałów z szybkością zbliżoną do kontroli. Istotne statystycznie zahamowanie wzrostu zaobserwowano w przypadku dwu polimerów: PCL 30%-TMC70% i PGA 30%-TMC70% (RYS. 2A). Oznaczenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w medium hodowlanym pozwoliło na stwierdzenie, że spośród badanych materiałów jedynie PGA 30%-TMC70% wywierało działanie cytotoksyczne, co manifestowało się zwiększonym uwalnianiem do pożywki tego cytozolowego enzymu (RYS. 2B).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że badane kopolimery charakteryzowała dobra tolerancja komórkowa i są one odpowiednimi materiałami do hodowli ludzkich komórek łącznotkankowych.

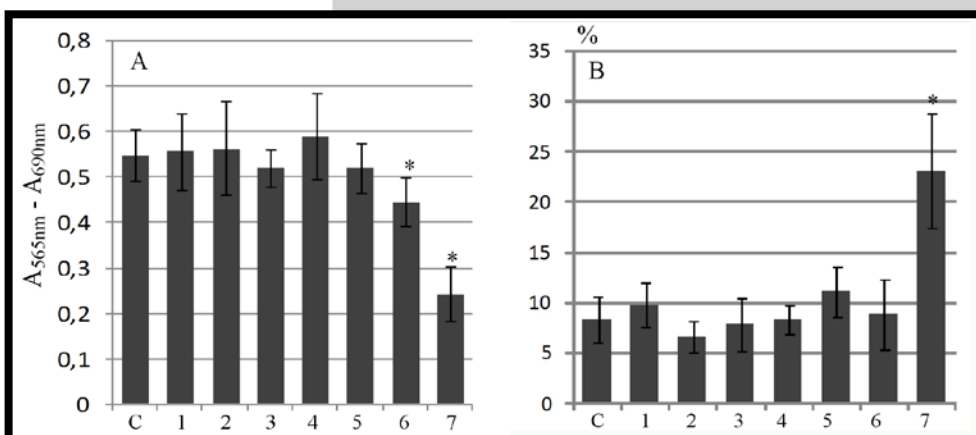
## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW (Nr N51800731/0433) oraz w ramach badań statutowych SUM (KNW-1-067/08).



RYS. 1. Adhezja fibroblastów HGF-1 do powierzchni materiałów polimerowych po 1 i 4 godzinach inkubacji; średnia  $\pm$  SD, \*P<0,05; (C. Kontrola; 1. PGA8%-PCL92%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA75%-PCL25%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA30%-TMC70%; 7. PGA30%-TMC70%).

FIG. 1. The fibroblast adhesion to the various polymer films after 1h and 4h of incubation; mean  $\pm$  SD, \*P<0,05; (C. Control; 1. PGA8%-PCL92%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA75%-PCL25%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA 30%-TMC 70%; 7. PGA30%-TMC70%).



RYS. 2. A) Wzrost fibroblastów HGF-1 na powierzchni materiałów polimerowych. B) Aktywność LDH w pożywce (% uwolnionego enzymu). Komórki hodowano na powierzchni materiałów 4 doby. Średnia  $\pm$  SD, \*P<0,05; (C. Kontrola; 1. PGA8%-PCL92%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA75%-PCL25%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA 30% - TMC 70%; 7. PGA30%-TMC70%).

FIG. 2. A) Growth of HGF-1 fibroblasts on various polymer films; B) Activity of LDH released to culture medium. The cells were cultured for 4 days. mean  $\pm$  SD, \*P<0,05; (C. Control; 1. PGA8%-PCL92%; 2. LPLA85%-PGA15%; 3. LPLA75%-PCL25%; 4. LPLA70%-TMC30%; 5. LPLA30%-TMC70%; 6. PGA 30% - TMC 70%; 7. PGA30%-TMC70%).

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N51800731/0433) and Medical University of Silesia (Grant No: KNW-1-067/08).

## Piśmiennictwo

- [1] Meyer U., Wiesmann H.P. Bone and Cartilage Engineering. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [2] Kasperczyk J., Stokłosa K., Trzepietowska-Stępień K., Wilczok A., Dobrzyński P., Bero M., Sokół M., Przybyszewski W., Jurkowski M.: Chemik, 59 (2006) 95-102.
- [3] Pamuła E., Buczyńska J., Menaszek E., Bačakova L., Dobrzyński P., Bero M. Chemik, 48 (2005) 57-62.
- [4] Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M. J.: Biomed. Mater. Res. A., 74, (2005), 591-597. Dobrzyński P., Kasperczyk J.: J. Polym. Sci., 44 (2006), 98-114.

## References

- [5] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M.: Macromolecules, 34, (2001), 5090-5098.
- [6] Dobrzyński P., Kasperczyk J.: J. Polym. Sci., 44, (2006), 98-114.
- [7] Pamuła E., Bačakova L., Buczyńska J., Filova E., Noskova L., Dobrzyński P., Bero M.: Eng. Biomater., 37, (2004), 11-15
- [8] Pamuła E., Błażewicz M., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., Kasperczyk J.: Ann. Transplant., 9, (2004), 64-67.
- [9] Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M.: J Biomed Mater Res A., 74, (2005), 591-597.

## WZROST I RÓŻNICOWANIE LUDZKICH CHONDROCYTÓW HODOWANYCH NA BIODEGRADOWALNYCH TRÓJWYMIAROWYCH NOŚNIKACH POLIMEROWYCH

JOANNA ORCHEL<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>2,4</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>3</sup>, PIOTR PADUSZYŃSKI<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>4</sup>, ARTUR PAŁASZ<sup>5</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>6</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>4</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII MOLEKULARNEJ UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>3</sup> AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>4</sup> POLSKA AKADEMIA NAUK, CENTRUM MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH I WĘGLOWYCH, UL. M.SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE, POLSKA

<sup>5</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA MORFOLOGII, ZAKŁAD HISTOPATOLOGII UL. MEDYKÓW 18, 40-752 KATOWICE, POLSKA

<sup>6</sup> ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII DZIECIĘCEJ UL. MEDYKÓW 18, 40-752 KATOWICE, POLSKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 8-11]*

### Wstęp

Dla rozwoju współczesnych form terapii schorzeń tkanki chrzęstnej, wykorzystujących osiągnięcia inżynierii tkankowej, istotne znaczenie mają poszukiwania nowych, biogodnych, bioresorbowalnych materiałów, które mogłyby być wykorzystane do wytwarzania trójwymiarowych podłoży, o mikrostrukturze i właściwościach sprzyjających zasiedlaniu przez komórki. Materiały te powinny być biokompatybilne i posiadać właściwości, które stymulują adhezję, namnażanie oraz różnicowanie hodowanych komórek. Najbardziej perspektywicznymi biomateriałami wydają się być syntetyczne polimery z grupy poliestrów alifatycznych. Kopolimery glikolidu, laktydu, ε-kaprolaktonu, a także trimetylenowęglanu (TMC) są powszechnie badane pod kątem ich wykorzystania do konstrukcji rusztowań dla komórek [1,2]. Jednakże, tradycyjne metody syntezy tych biomateriałów wykorzystują toksyczne związki cyny jako inicjatory procesu kopolimeryzacji.

## GROWTH AND DIFFERENTIATION OF HUMAN CHONDROCYTES ON BIODEGRADABLE POLYMERIC SCAFFOLDS

JOANNA ORCHEL<sup>1</sup>, ARKADIUSZ ORCHEL<sup>2</sup>, JANUSZ KASPERCZYK<sup>2,4</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>3</sup>, PIOTR PADUSZYŃSKI<sup>2</sup>, PIOTR DOBRZYŃSKI<sup>4</sup>, ARTUR PAŁASZ<sup>5</sup>, IRENEUSZ BIELECKI<sup>6</sup>, KATARZYNA JELONEK<sup>4</sup>, ZOFIA DZIERŻEWICZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, 1, NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF BIOPHARMACY, 1 NARCYZÓW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>3</sup> UST-AGH, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, 30, MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>4</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCE CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, 34 M.CURIE-SKŁODOWSKIEJ STR., 41-819 ZABRZE, POLAND

<sup>5</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF HISTOLOGY, 18, MEDYKOW STR., 40-752 KATOWICE, POLAND

<sup>6</sup> MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, DEPARTMENT OF PEDIATRIC SURGERY, 18, MEDYKOW STR., 40-752 KATOWICE, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 8-11]*

### Introduction

Finding of novel bioresorbable materials suitable to fabrication of scaffolds possessing microstructure and properties facilitating colonization by cells is an important factor influencing the development of modern methods of treatment for cartilage repair. These materials must be biocompatible to be well tolerated by the body as well as must support cell adhesion, growth and differentiation. Biodegradable synthetic polymers as aliphatic polyesters seem to be the most promising materials for tissue engineering. Copolymers of glycolide, lactide, ε-caprolactone and trimethylene carbonate (TMC) are commonly used for scaffold fabrication [1,2]. Traditional methods of their synthesis employ highly toxic tin compounds as initiators of polymerization. Complete elimination of these compounds from the polymers is practically impossible which results in their slow penetration into patients blood circulation system. Therefore, the novel methods of fabrication of these materials have been developed recently. These methods rely on the use of non-toxic zirconium compounds as initiators of polymerization [2,3,4].

Całkowita eliminacja tych inicjatorów z kopolimeru jest praktycznie niemożliwa, co skutkuje ich powolnym przenikaniem do układu krążenia. W ostatnich latach, opracowano nowe metody syntezy tych kopolimerów oparte na zastosowaniu praktycznie nietoksycznych cyrkonowych inicjatorów polimeryzacji [2,3,4].

Celem niniejszej pracy jest ocena możliwości wykorzystania trójwymiarowych podłoży, wytworzonych z kopolimeru L-laktydu i glikolidu, syntetyzowanego przy użyciu nietoksycznego inicjatora kopolimeryzacji - acetyloacetonianu cyrkonu, do hodowli ludzkich chondrocytów. Podłoża wytworzone zostały zgodnie ze zmodyfikowaną metodą odlewania z roztworu i wypłukiwania cząsteczek porogenu [2]. Podłoża takie posiadały znacznie większą porowatość otwartą i przepuszczalność dla płynów niż otrzymywane metodą klasyczną.

## Materiały i metody

Chondrocyty izolowano z chrzęstnych fragmentów przegrody nosowej pacjentki w wieku 33 lat wg. uprzednio opisaną metodę [5]. Komórki hodowano w pożywce MEM zawierającej 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS), penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 µg/ml), kwas askorbinowy (50 µg/ml), suplement „MEM-Non Essential Amino Acids” (1×) i bufor HEPES (10 mM). Hodowlę prowadzono w temp. 37°C, w atmosferze o składzie 95% powietrze/5% CO<sub>2</sub>. Chondrocyty hodowano na porowatych podłożach, wykonanych z kopolimeru L-laktydu i glikolidu, w którym molowy stosunek obu monomerów wynosił 85:15. Kopolimer został zsyntetyzowany z wykorzystaniem acetyloacetonianu cyrkonu, jako inicjatora polimeryzacji. Średnia masa cząsteczkowa (M<sub>n</sub>) kopolimeru wynosiła 50kDa, średnia długość bloków laktydylowych i glikolidylowych wynosiła odpowiednio 14,7 i 2,6. Polimerowe gąbki w postaci krążków o średnicy 12 mm i wysokości 2 mm otrzymano zmodyfikowaną metodą odlewania z roztworu/wypłukiwania soli [2]. Porowatość podłoża wynosiła 83%, a rozmiar porów mieścił się w zakresie 250-320 µm. Na górną powierzchnię polimerowego nośnika, umieszczonego w naczyniu hodowlanym, nanoszono 5×10<sup>6</sup> chondrocytów. Hodowlę prowadzono siedem dni. Kontrolę stanowiły chondrocyty hodowane w warunkach standardowych (hodowla 2D). Jedną z prowadzonych hodowli 2D charakteryzowała się wysokim zagęszczeniem chondrocytów (9×10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>), natomiast druga prowadzona była w zagęszczeniu umiarkowanym (10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup>), pozwalającym chondrocytom na intensywną proliferację.

Oceny zasiedlenia nośnika, przez chondrocyty, dokonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Olympus Fluoview, po wybarwieniu komórek jodkiem propidyny (5 µg/ml). Do wyznaczenia liczby chondrocytów zasiedlających badane gąbki wykorzystano test „CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit” (Molecular Probes).

Aktywność transkrypcyjną genów białek macierzy pozakomórkowej: agrekanu i kolagenu I oraz genu histonu H3 badano w chondrocytach hodowanych zarówno w pożywce o standardowym składzie, jak i w medium pozbawionym FBS, zawierającym następujące suplementy: ITS-A (1×), TGF-β1 (10 ng/ml), deksametazon (100 nM) oraz bogata w lipidy albumina bydlęca (1,25 mg/ml).

Ekstrakcję RNA z chondrocytów prowadzono przy pomocy zestawu „RNeasy Mini Kit” (Qiagen). W celu całkowitego wyeliminowania komórkowego DNA z ekstraktów zastosowano zestaw „RNase-Free DNase Set” (Qiagen). Startery do reakcji RT-PCR, specyficzne do sekwencji badanych transkryptów, a także endogennej kontroli (GAPDH) zaprojektowano przy użyciu programu Primer Express™ 2.0.

In this report, porous scaffolds made of the copolymer of L-lactide and glycolide synthesized with the use of zirconium acetylacetonate are evaluated with respect to in vitro chondrocyte cultures. The scaffolds were developed by a modified solvent casting/particulate leaching technique [2]. The modified method allowed to obtain scaffolds having higher open porosity and permeability compared to classical method.

## Materials and methods

The cells were isolated from the specimen of cartilage from the nasal septum of thirty three year old patient as described previously [5]. Isolated cells were cultured in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml ascorbic acid, MEM-Non Essential Amino Acids (1×), 10 mM HEPES buffer. Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5%CO<sub>2</sub>.

Chondrocytes were cultured on porous scaffolds made from the copolymer of L-lactide and glycolide (PLG), with a molar ratio of L-lactide to glycolide 85:15. The copolymer was synthesized with the use of zirconium acetylacetonate as an initiator of polymerization. The number-average molecular weight (M<sub>n</sub>) of PLG was 50 kDa and average lengths of the lactidyl and glycolidyl blocks were 14.7 and 2.6 respectively. The scaffold disks (12 mm diameter, 2 mm thickness) were produced by a modified solvent casting/particulate leaching technique [2]. The porosity of the obtained sponges was about 83% and the pore diameters were 250-320 µm. Cell suspension containing 5×10<sup>6</sup> chondrocytes was loaded onto an upper side of each scaffold and constructs were statically cultured for seven days. Chondrocytes growing in the standard monolayer culture were used as control materials. High-density monolayer cultures were established by seeding 9×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. In low-density cultures chondrocytes were plated at a cell density of 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>. The cells were seeded at low density to stimulate cell proliferation. Colonization of scaffolds with chondrocytes was estimated using a confocal microscope Olympus Fluoview after cell staining with propidium iodide (5 µg/ml). Cell number in scaffolds was quantitated using “CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit” (Molecular Probes).

Transcriptional activity of genes coding for extracellular matrix proteins: collagen I and aggrecan as well as a histone H3 gene was determined in chondrocytes cultured both in standard culture medium and in medium without FBS, containing ITS-A (1×), TGF-β1 (10 ng/ml), dexamethasone (100 nM) and lipid-rich bovine serum albumin (1,25 mg/ml). The total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit™ (Qiagen). Genomic DNA was eliminated from the extracts by use of „RNase-Free DNase Set” (Qiagen). The primers for PCR amplification were designed using Primer Express 2.0.

Reverse transcription was performed by use of „MasterAmp™ Tth DNA Polymerase” kit. QPCR has been performed by use of „QuantiTect SYBR Green PCR Kit” (Qiagen). The reaction was performed in a volume of 20µl. Each sample was assayed eight times. The analysis was performed with the use of a DNA Engine Opticon™ (BIO-RAD). The specificity of PCR reaction was confirmed by melting curve analysis and by use of electrophoresis on 6% polyacrylamide gels, stained with silver.

The transcriptional activity of target genes was expressed in samples versus control and calculated using the equation:

$$R = \frac{(1+E_b)^{\Delta C_t b}}{(1+E_r)^{\Delta C_t r}}$$



Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy pomocy zestawu „MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase”. Natomiast reakcję QPCR przeprowadzono przy użyciu zestawu „QuantiTect SYBR Green PCR Kit” (Qiagen) w mieszaninie reakcyjnej o obj. 20 µl. Oznaczenie każdej próby powtarzano ośmiokrotnie. Analizę wykonano przy pomocy aparatu DNA Engine Opticon™ (BIO-RAD). Specyficzność reakcji RT-QPCR potwierdzono za pomocą analizy krzywych topnienia oraz techniką elektroforezy w 6% żelu poliakrylamidowym, barwionym azotanem srebra.

Zmianę poziomu względnej ekspresji (R) genów agrekanu, kolagenu I oraz histonu H3 w stosunku do kontroli wyliczano na podstawie poniższego wzoru:

$$R = \frac{(1+E_b)^{\Delta Ct_b}}{(1+E_r)^{\Delta Ct_r}}$$

gdzie:

$$\Delta Ct_b = (Ct_{\text{genu badanego w kontrol}} - Ct_{\text{genu badanego w próbce badanej}})$$

$$\Delta Ct_r = (Ct_{\text{genu referencyjnego w kontrol}} - Ct_{\text{genu referencyjnego w próbce badanej}})$$

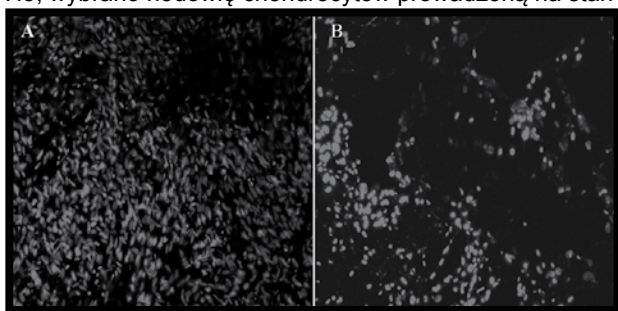
$E_b$  i  $E_r$  - wydajność reakcji PCR odpowiednio: dla badanego transkryptu i endogennej kontroli.

$Ct$  – cykl reakcji PCR, w którym krzywa przyrostu fluorescencji przecina zdefiniowany próg (threshold cycle)

## Wyniki i dyskusja

Analiza zasiedlenia porowatych, bioresorbowalnych nośników polimerowych została dokonana w oparciu o obrazy 3D uzyskane z mikroskopu konfokalnego (RYS. 1). Chondrocyty obecne były zarówno w górnych jak i w dolnych partiach badanych podłoży. Obecność chondrocytów w ich dolnych warstwach stanowi dowód migracji komórek oraz kolonizacji całej objętości rusztowania. Analiza wykonana przy pomocy zestawu „CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit” pozwoliła na stwierdzenie, że, po siedmiodniowej hodowli, ok. 80% chondrocytów zlokalizowanych było w polimerowej gąbce, natomiast pozostałe komórki rosły na powierzchni naczynia hodowlanego. Obecność chondrocytów poza nośnikiem mogła być spowodowana ich przemieszczeniem, podczas nanoszenia zawiesiny komórek na podłoże.

Jako hodowlę referencyjną, w badaniach aktywności transkrypcyjnej genów kolagenu I, agrekanu oraz histonu H3, wybrano hodowlę chondrocytów prowadzoną na stan-



RYS. 1. Obrazy 3D z mikroskopu konfokalnego: górna (A) i dolna (B) powierzchnia porowatego polimerowego podłoża zasiedlonego przez chondrocyty. Na nośnik nakładano  $5 \times 10^6$  komórek, następnie prowadzono ich hodowlę przez 7 dni (powiększenie obiektywu 10×; Przekroje optyczne wykonane zostały do głębokości 200 µm od powierzchni podłoża).

FIG. 1. 3D confocal images: upper (A) lower (B) surface of porous polymeric scaffold colonized by chondrocytes.  $5 \times 10^6$  cells were seeded on scaffold and cultured for 7 days (obj. 10×; optical sections were acquired to a depth 200 µm).

where:

$$\Delta Ct_b = (Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{sample}})$$

$$\Delta Ct_r = (Ct_{\text{control}} - Ct_{\text{isample}})$$

$E_b$  i  $E_r$  - amplification efficiency of the target and normalizer assay respectively

$Ct$  - threshold cycle: the cycle number at which an amplification plot crosses defined threshold fluorescence level

## Results and discussion

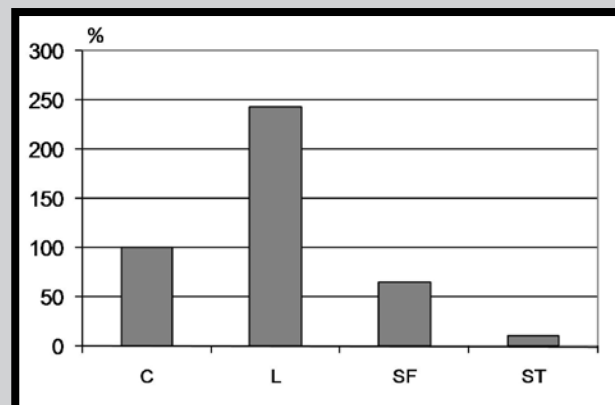
Colonization of biodegradable scaffolds was estimated using confocal microscopic analysis and 3D image construction (FIG. 1). Chondrocytes were detected both in upper and lower parts of the scaffold discs.

The presence of cells in lower parts of the scaffold proves their ability to migrate and colonize the whole volume of the carrier. On day 7 after seeding 80% of cells were present inside the scaffolds and remaining chondrocytes grew on the culture dish bottom underlying the scaffold disks as revealed by CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit. Presence of cells below the scaffold could result from their moving during the seeding process.

In the study of collagen I, aggrecan and histone H3 transcriptional activity chondrocytes seeded on the standard polystyrene substrate at a density  $9 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were used as the calibrator. Transcriptional activity in these cells was designated as 100%. In all the other samples all transcripts were quantified relative to the calibrator sample.

It is known that histone H3 gene is expressed during the S-phase of the cell cycle [6]. Therefore, histone H3 mRNA level is considered as a reliable marker of proliferative activity of cells. Histone H3 mRNA levels in chondrocytes growing in various culture conditions are shown in FIG. 2. The highest expression level was found in the cells growing in low-density monolayer cultures. H3 mRNA level measured in chondrocytes on scaffolds incubated in medium containing FBS was similar to the control. The proliferation rate of chondrocytes growing in medium without FBS but containing insulin, TGF-β1 and dexamethasone was very low.

Mature chondrocytes synthesize the components of the cartilage extracellular matrix such as collagen II and aggrecan. These cells do not produce type I collagen [7].



RYS. 2. Aktywność transkrypcyjna genu histonu H3; C) kontrola; L) komórki w hodowli o niskim zagęszczeniu; SF) hodowla na gąbce polimerowej w standardowej pożywce (zawierającej FBS); ST) hodowla na gąbce w pożywce bez surowicy; Poziom ekspresji w kontroli przyjęto za 100%.

FIG. 2. Histone H3 transcriptional activity; C) control; L) low-density monolayer culture; SF) cells cultured on scaffolds in standard medium; ST) cells cultured on scaffolds in FBS-free medium; Control value was taken as 100%.

dardowym polistyrenowym podłożu, w zagęszczeniu  $9 \times 10^5$  komórek/cm<sup>2</sup>. Poziom aktywności transkrypcyjnej w tych komórkach przyjęto za 100%. Zmiany ekspresji w badanych hodowlach odnoszono do tej hodowli kontrolnej.

Uważa się, że mRNA histonu H3 pojawia się w komórce wyłącznie podczas fazy S cyklu komórkowego [6]. Z tego względu poziom transkryptu tego genu jest wiarygodnym markerem aktywności proliferacyjnej komórek. Na RYS. 2 przedstawiono zmiany poziomu transkryptu histonu H3 w chondrocytach w zależności od warunków hodowli. Najwyższy poziom ekspresji tego genu zaobserwowano w hodowlach o niskim zagęszczeniu komórek. Poziom ekspresji histonu H3 w chondrocytach rosnących na porowatym podłożu był zbliżony do kontroli pod warunkiem, że rosły one w standardowej pożywce zawierającej surowicę. Komórki hodowane w medium pozbawionym surowicy, a zawierającym insulinę, TGF- $\beta$ 1 i deksametazon, charakteryzowały się bardzo niską aktywnością proliferacyjną.

Dojrzałe komórki chrzęstne odznaczają się zdolnością do syntezy typowych dla tkanki chrzęstnej składników macierzy pozakomórkowej, m.in. kolagenu II i agrekanu, nie wytwarzają natomiast kolagenu I [7]. Stwierdzono, że chondrocyty hodowane w standardowych warunkach (hodowla 2D) ulegają odróżnicowaniu w kierunku komórek fibroblastopodobnych: przestają produkować kolagen typu II i agrekan, a zaczynają produkować kolagen typu I. Jak wynika z danych zamieszczonych na RYS. 3 aktywność transkrypcyjna genu agrekanu była najniższa w chondrocytach hodowanych w niewielkim zagęszczeniu i wynosiła zaledwie 24,5% aktywności w komórkach kontrolnych. Wzrost na trójwymiarowym nośniku sprzyjał ponownemu różnicowaniu się tych komórek w kierunku dojrzałych, funkcjonalnych chondrocytów. Świadczy o tym wysoka ekspresja agrekanu, wynosząca 322% ekspresji obserwowanej w kontroli. Znaczny wzrost ekspresji agrekanu obserwowany był tylko w komórkach rosnących w pożywce zawierającej surowicę. Komórki hodowane w medium pozbawionym surowicy charakteryzowały się stosunkowo niską aktywnością transkrypcyjną obu badanych genów (RYS. 3). Spadek aktywności transkrypcyjnej kolagenu I był jednak większy niż spadek aktywności genu agrekanu.

Wykonane w niniejszej pracy badania dowiodły, że porowate podłoża wykonane z kopolimeru laktydu i glikolidu, zsyntetyzowanego przy użyciu acetyloacetonianu cyrkonu, odznaczały się zadowalającą biogodnością w stosunku do komórek tkanki chrzęstnej. Aktywność transkrypcyjna histonu H3 wskazuje, że chondrocyty zachowały zdolność do podziałów komórkowych. Ponadto struktura badanych gąbek sprzyjała ponownemu różnicowaniu się chondrocytów, rosnących uprzednio w postaci monowarstwy.

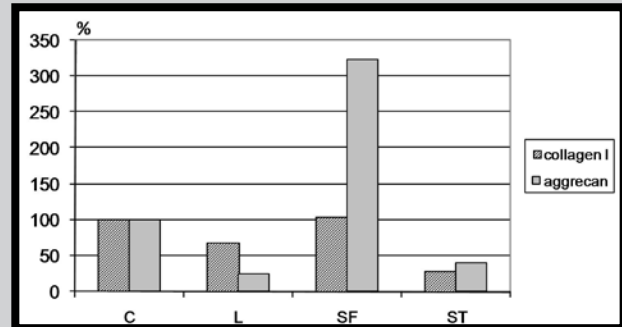
## Podziękowania

Praca finansowana z grantu MNiSW (Nr N51800731/0433) oraz w ramach badań statutowych SUM (KNW-1-067/08).

## Piśmiennictwo

- [1] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: *Biomaterials*, 17 (1996) 93-102.
- [2] Pamula E., Filová E., Bačáková L., Lisá V., Adamczyk D.: *J. Biomed. Mater. Res. A.*, (w druku)
- [3] Kasperczyk J., Stokłosa K., Trzepietowska-Stępień K., Wilczok A., Dobrzyński P., Bero M., Sokół M., Przybyszewski W., Jurkowski M.: *Chemik*, 2 (2006) 95-102.

It has been shown that chondrocytes dedifferentiate in monolayer (2D) culture. The cells become fibroblast-like, losing their ability to synthesize collagen II and aggrecan and producing increased amounts of collagen type I. As shown in FIG. 3, the lowest aggrecan gene expression was found in the cells growing in low-density monolayer cultures. It was merely 24,5% of control value. Tridimensional architecture of the scaffold was capable of promoting chondrocyte redifferentiation. This is evidenced by an increase in aggrecan mRNA expression that reached value of 322% of control level. A significant elevation of aggrecan mRNA level was exclusively observed in cells cultured in medium containing FBS. The transcriptional activity of both studied genes was relatively low in chondrocytes growing in FBS-free medium (FIG. 3). However, the decrease of collagen I gene activity was larger, than the decrease of aggrecan expression.



**RYS. 3. Aktywność transkrypcyjna genów kolagenu I oraz agrekanu: C) kontrola; L) komórki w hodowli o niskim zagęszczeniu; SF) hodowla na gąbce polimerowej w standardowej pożywce (zawierającej FBS); ST) hodowla na gąbce w pożywce bez surowicy; Poziom ekspresji w kontroli przyjęto za 100%.**

**FIG. 3. Transcriptional activity of collagen I and aggrecan genes: C) control; L) low-density monolayer culture; SF) cells cultured on scaffolds in standard medium; ST) cells cultured on scaffolds in FBS-free medium; Control value was taken as 100%.**

Generally, it should be concluded that scaffolds made of the copolymer of L-lactide and glycolide synthesized with the use zirconium acetylacetonate are biocompatible and appropriate for human chondrocytes growth. Transcriptional activity of histone H3 gene indicates that chondrocytes retained the ability to divide. Moreover, structure of the scaffolds favoured redifferentiation of chondrocytes, previously cultured in monolayer.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education (Grant No: N51800731/0433) and Medical University of Silesia (Grant No: KNW-1-067/08).

## References

- [4] Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M. J.: *Biomed. Mater. Res. A.*, 74 (2005) 591-597.
- [5] Orchel A., Dylla A., Jelonek K., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Owczarek A., Bielecki I., Dzierżewicz Z.: *Engineering of Biomaterials*, 9 (2006) 223-226
- [6] Koessler H., Doenecke D., Albig W.: *DNACell Biol.*, 22 (2003) 233-241.
- [7] Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH.: *Tissue Eng.*, 12 (2006) 1971-1984.

# PROJEKTOWANIE BIOMATERIAŁÓW GRADIENTOWYCH O ZAŁOŻONYCH MODUŁACH YOUNGA I ICH ANALIZA EKSPERYMENTALNA

JAN CHŁOPEK, KATARZYNA MIGACZ\*

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA  
\* E-MAIL: KATARZYNAMIGACZ@TLEN.PL

## Streszczenie

Autorzy artykułu przedstawiają zaprojektowany model materiału gradientowego do zastosowań medycznych, z kontrolowaną, stopniową zmianą modułu Younga w jego budowie. Po zaprojektowaniu materiału została określona jego mapa rozkładu naprężeń przy pomocy programu komputerowego NEi Nastran for Windows wykorzystującego metodę elementów skończonych (MES). Do badań eksperymentalnych zostały wykonane próbki z polisulfonu (PSU) wzmocnionego jednokierunkowym włóknem węglowym długim (CF 1D). Wykonany kompozyt o gradientowej budowie wykazuje przydatność jako materiał o dopasowanym module Younga z wartościami podawanymi przez innych autorów dla kości gąbczastej i pierścienia włóknistego krążka międzykręgowego.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 12-16]

## Wstęp

Współczesne badania bioinżyneryjne w ogólnym zarysie prowadzą się do prób naśladowania budowy i funkcji elementów organizmu żywego. Zadanie to jest bardzo trudne ze względu na złożoność funkcji narządów i ich ciągle biologiczny proces dostosowawczy do warunków życia człowieka. Przykładem tkanki, która w sposób ciągły ulega przebudowie i dostosowuje się do zmian obciążeń, jest tkanka kostna. Jej budowa jest bardzo niejednorodna, stanowi ją istota gąbczasta i kość korowa. Tkanekę gąbczastą tworzy sieć elastycznych beleczek o doraźnej wytrzymałości na ściskanie w granicach 1,5-2,0 MPa, i odkształceniu w granicach 0,03-0,6%. Kość zbita stanowi twardą warstwę zewnętrzną o wysokiej wytrzymałości mechanicznej, przy doraźnej wytrzymałości na ściskanie od 100–280 MPa, odkształca się w granicach 1-2,4% [1]. Z punktu widzenia struktury i kompozycji elementów kość jest specyficznym układem gradientowym, w którego budowie wyróżniamy płynne przejścia takich parametrów, jak: modułu Younga, porowatości, czy też czasu resorpcji tkanki kostnej. Podstawowym wymogiem biomechanicznym dla projektowanych materiałów jest dopasowanie modułów Younga kości i implantu, aby maksymalnie ograniczyć zjawisko tzw. „przesztyniania kości”. Szansą na spełnienie tych wymagań są materiały gradientowe, w których dzięki kontrolowanej zmianie parametrów otrzymujemy połączenie kilku właściwości, które otrzymać jednocześnie jest bardzo trudno. Główną zaletą tworzyw gradientowych jest brak granic pomiędzy elementami składowymi, co podwyższa zdecydowanie ich wytrzymałość i nie powoduje narażenia materiału na ścinanie warstw [2].

# PLANS OF GRADIENT BIOMATERIALS WITH ASSUMPTED YOUNG'S MODULUS AND THEIR ANALYSIS

JAN CHŁOPEK, KATARZYNA MIGACZ\*

AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30, MICKIEWICZA 30 AV., 30-059 CRACOW, POLAND  
\* E-MAIL: KATARZYNAMIGACZ@TLEN.PL

## Abstract

The authors of this paper describe designed (introduce) designed model of gradient materials for medical application. This material has monitoring progressive changes of Young's modulus in its structure. After material's designed it was defined its map of stress distribution by using program NEi Nastran for Windows with MES. Samples for investigation were made from polysulfone (PSU) with one-dimensional carbon fibers (1D). Composite with gradient structure shows usability as material with Young's modulus adapted with values obtained by another authors for spongy bone and fibroform ring of intervertebral disc.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 12-16]

## Introduction

Present bioengineering examinations to resolve itself into tests of imitation structure and functions elements of living organism. This task is very difficult because of complexity functions of the organs and these biological adaptional process to the conditions of human life. An example of tissue which in continuous way is reconstructed and accommodates to changed loads is the bone issue. Its structure is very unhomogenous and consist of spongy matter and outerbone. Spongy issue create network flexible queens closures with immediate compression strength in limits 1,5-2,0 MPa, and compressive strain in limits 0,03-0,6%. Dense bone is create external shell with high mechanical strength with immediate compression strength from 100 to 280 MPa, and compressive strain is from 1% to 2,4%. On the stroke of view structures and composition of elements the bone is specific gradient structure, in which we can distinguish continuous pathways parameters such as these: Young's modulus, porosity or time of resorption of issue bone. Basic biomechanical requirement for designed materials is matching Young's modulus of the bone and the implants and keep to a minimum the effect of named "over – rigid of the bones". Gradient materials are chance for meet requirements because of monitoring changes of parameters we take out connection of few qualities, which to receive simultaneously is very difficult. Main quality of gradient materials is no limits between components, it makes higher strength absolutely, and doesn't cause the risk of shearing layers [2]. High biological biostability likewise now used in medicine as elements joining (bone plates, screws, clamps), artificial pins of ilium's articulation show composites PSU–CF. Carried out investigations show their usability as materials with stiffness modulus adapted with stiffness of outerbone data and fibroform ring of intervertebral disc. The application of computer's simulation MES lets to choose the best of gradient material's models, fulfilled requirements.

Wysoką biostabilnością biologiczną jak również stosowanymi obecnie w medycynie jako elementy zespalające (płytki, śruby, klamry), trzpienie endoprotez stawu biodrowego, wykazują się kompozyty polisulfon – włókno węglowe. Przeprowadzone badania wskazują na ich przydatność jako materiału o dopasowanym module sztywności z danymi dotyczącymi sztywności kości korowej i pierścienia włóknistego krążka międzykręgowego.

Zastosowanie modelowania komputerowego MES pozwala wybrać z zaprojektowanych układów gradientowych najlepsze, spełniające założone kryteria, modele. Konieczne jest poddanie wybranych tą metodą układów weryfikacji eksperymentalnej, co pozwoli ocenić ich właściwości uwzględniające niedoskonałą, rzeczywistą mikrostrukturę.

## Materiały i metody

Za pomocą programu NEi Nastran for Windows wykorzystującego MES zaprojektowano materiały o zadanych wartościach modułu Younga E. Przyjęto do obliczeń modelowych wartości E wyliczone z odwrotnego prawa mieszanin:  $E_{10}=E_w E_c / [E_w (1-V_w) + E_c V_w] = 2300 \text{ MPa}$ ;  $E_{20}=2600 \text{ MPa}$ ;  $E_{30}=3000 \text{ MPa}$ ;  $E_{40}=3470 \text{ MPa}$ ; wymiary kostki przyjęto  $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}$ , grubość każdej z pięciu warstw  $g=2 \text{ mm}$ .

Próbki o różnych udziałach procentowych włókien, dla układu warstw (od dołu): 10%, 10%, 20%, 30%, 40%, zostały wykonane metodą prepregów z PSU o masie cząsteczkowej  $M=22000$  wzmocnionego CF 1D (Torayca T-300,  $E=230 \text{ GPa}$ ,  $\sigma_r=3,53 \text{ GPa}$ ,  $d=1,76 \text{ g/cm}^3$ ).

Aby określić mikrostrukturę materiału, na próbkach wykonano badania gęstości pozornej, objętości porów otwartych według normy PN-H-0485:1979, badania ultradźwiękowe. Metodą ultradźwiękową wykonano dwa rodzaje pomiarów: ogólny – w trzech kierunkach: a (zgodnie z kierunkiem prasowania), b (prostopadle do kierunku ułożenia włókien), c (w kierunku ułożenia włókien) (RYS. 1). Głowice przyłożono do całej powierzchni próbki, następnie do każdej z warstw. Następnie próbki gradientowe poddano obciążeniu ściskającemu na maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 o zakresie pomiarowym do 5000N.

## Omówienie wyników

Celem zastosowania symulacji komputerowej było otrzymanie mapy rozkładu naprężeń i odkształceń dla zaprojektowanego materiału. Z wyznaczonych modeli wybrano najlepiej dopasowane do przyjętych założeń wytrzymałościowych i odkształceniowych (TABELA 1), jednocześnie możliwe technicznie do wykonania i przedstawiono ich mapy rozkładu naprężeń i odkształceń na RYS. 2, 3.

Najwyższe naprężenia występują w dwóch górnych warstwach materiału, o założonych udziałach procentowych CF (od góry) 40 i 30%. Wartość średnia dla najwyższych wartości naprężeń przy sile obciążającej 5000 N wynosi 51,89 MPa, a odkształcenie przy maksymalnej sile ściskającej wynosi 0,194 mm.

Wyniki badań gęstości pozornej:  $p_{1sr}=1,32 \pm 0,02$ ; i objętości porów otwartych:  $V_{1sr}=0,025 \pm 0,010$ , wskazują na liczne niejednorodności i obecność ok. 2,5% pustek w mikrostrukturze próbek. Wyniki pomiarów ultradźwiękowych ogólnych dla trzech kierunków (a,b,c) przedstawiono na WYKRESIE 1, warstwowych – dla kierunków b i c na WYKRESACH 2 i 3.

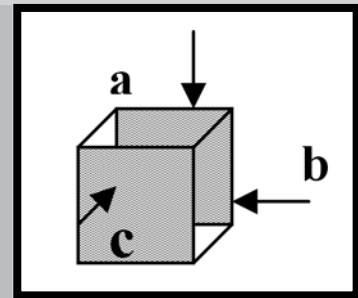
Z przedstawionych wykresów wynika, że najwyższe prędkości fal ultradźwiękowych dla każdej z próbek występują w kierunku c (wzdłuż włókien), co świadczy o tym, że w tym kierunku włókna są fazą o największym module Younga. Dla próbki nr 2 z przedstawionej serii w kierunku a

It's necessary experimental verification of chosen by this method gradient systems, it lets evaluate there properties taking in account real microstructure.

## Materials and methods

Using NEi Nastran for Windows program availing MES, there were designed materials with given values of Young's modulus E. For modelling calculations it was taken values E calculated from the opposite law of mixing:  $E_{10}=E_w E_c / [E_w (1-V_w) + E_c V_w] = 2300 \text{ MPa}$ ;  $E_{20}=2600 \text{ MPa}$ ;  $E_{30}=3000 \text{ MPa}$ ;  $E_{40}=3470 \text{ MPa}$ ; the dimensions of the cube were taken  $10 \times 10 \times 10 \text{ mm}$ , thickness for each from five layers  $g=2 \text{ mm}$ . The samples with different percentages fibres for layer's system (undersurface): 10%, 10%, 20%, 30%, 40% were made prepreg's method from PSU with formula weight  $M=22000$  reinforced CF 1D (Torayca T-300,  $E=230 \text{ GPa}$ ,  $\sigma_r=3,53 \text{ GPa}$ ,  $d=1,76 \text{ g/cm}^3$ ). To define material's microstructure, on the samples it was carried out investigations of apparent density, volume of piping by the norm PN – H – 0485:1979. Using ultrasonic methods it was carried out two kinds of measurements: general – in three directions: a (in according to pressing direction), b(perpendicular to direction of fibres packing), c (in the direction of fibres packing) (FIG. 1). Ultrasonic measurement's head was applied to all surface of the sample, next to each of layers. Afterwards gradient samples subject to a compressioning load on the testing machine Zwick 1435 with measuring range to 5000N.

RYS. 1. Kierunki przyłożenia głowic. FIG. 1. The directions of apply ultrasonic measurement's heads.



## Description of results

The aim of usage computer's simulation was received the map of stress and strain distribution for designed material. From determined models there were chosen the best conditioned to supposed stress and strain (TABLE 1), simultaneously possible to make and there were shown its maps of stress and strain distribution on the FIG.2,3.

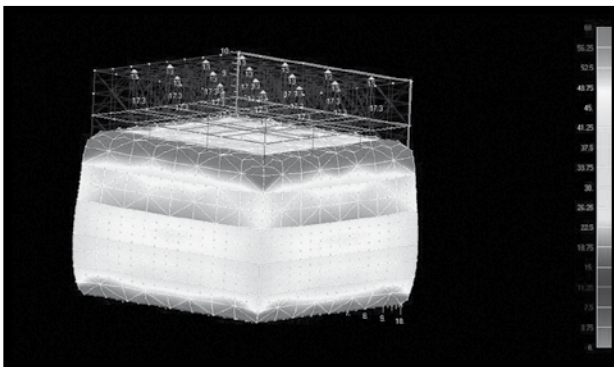
The highest of the stresses there are in two upper layers of the material, with supposed percentage of CF(from above) 40 and 30%. Average value for the highest values of stresses with loading force 5000N is 51,89MPa, and deformation with maximum of compressioning force is 0,194mm.

The results of the investigation of apparent density:  $p_{1sr}=1,32 \pm 0,02$  and volume of piping show for numerous inhomogeneities and presence among 2,5% piping in microstructures of samples. The results of general ultrasonic measurements in three directions(a,b,c), there were shown on DIAGRAM 1, laminar – for directions b and c on DIAGRAM 2 and 3.

From presented diagrams result from the highest speed of ultrasonic waves for every sample there are in direction c (along fibres), it means that in this direction the fibres makes the phase with maximum Young's modulus. For sample nr 2 from represented series in direction a speed of ultrasonic wave is higher then for direction b, it shows on more solid material including less number of microstructure's failure.

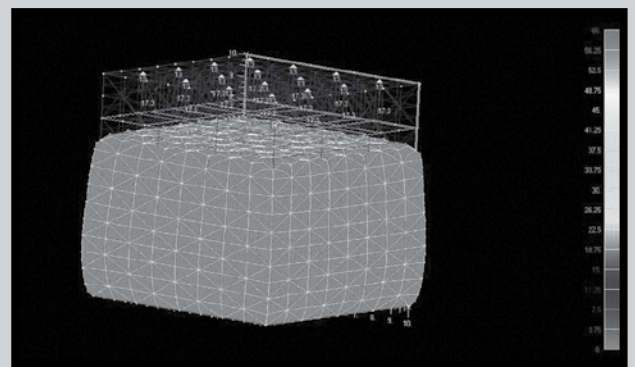
**TABELA 1. Zestawienie założeń i wyników badań autorów z danymi literaturowymi [1,3,4,5].**  
**TABLE 1. Comparison of assumption and results of investigation authors with literature data [1,3,4,5].**

Przyjęte założenia[4] Assumption[4]	Właściwości mechaniczne (E [GPa], $\epsilon$ [%], $\sigma$ [MPa]) Mechanical properties (E [GPa], $\epsilon$ [%], $\sigma$ [MPa])					
	świeżego krążka międzykręgowego w zależności od miejsca pobrania of fresh intervertebral disc dependent from the place of taken	dla pierścienia włóknistego for fibroform ring	dla kości zbitiej for outer-bone	dla kości gąbczastej for spongy bone	wyniki modelowania komputerowego the results of computer's simulation	wyniki badań eksperymentalnych the results of experimental investigations
Kręgosłup szyjny: Cervical spine: F=1200 [N]	$\epsilon=7,1+89$	E=0,25–0,9	E=10–20	E=0,05–1	$\sigma=51,89$	E=0,53
Kręgosłup piersiowy: Thoracic spine: F=2100 [N]	$\epsilon=40+55$	$\epsilon= -$	$\epsilon=1-2,4$	$\epsilon=0,03-0,6$	$\epsilon=1,94$	$\epsilon=8$
Kręgosłup lędźwiowy: Lumbar spine: F=4000 [N]	$\epsilon=52+68$					$\sigma=47,92$



**RYS. 2. Mapa rozkładu odkształceń dla materiału o następujących udziałach procentowych włókien (od dołu): 10%, 10%, 20%, 30%, 40%, wartość przyłożonej siły 5000 [N].**

**FIG. 2. The map of strain distribution for material with percentage of fibers (undersurface): 10%, 10%, 20%, 30%, 40%, force's value 5000 N.**



**RYS. 3. Mapa rozkładu naprężeń dla materiału o następujących udziałach procentowych włókien (od dołu): 10%, 10%, 20%, 30%, 40%, wartość przyłożonej siły 5000 [N].**

**FIG. 3. The map of stress distribution for material with percentage of fibers (undersurface): 10%, 10%, 20%, 30%, 40%, load's value 5000 N.**

prędkość fali jest większa, niż dla kierunku b, co wskazuje na bardziej lity materiał zawierający mniejszą ilość defektów w mikrostrukturze. WYKRESY 2 i 3 wskazują na układ gradientowy próbek oraz dowodzą zmniejszania się udziału procentowego włókien od lewej do prawej strony (próbki mierzone od górnej warstwy). Mniejszy słupek dla warstwy b5 w stosunku do b4 mieści się w granicach błędu.

Aby porównać otrzymane metodą symulacji komputerowej wartości  $\epsilon$ , wykonano charakterystyki odkształceniowe. Wykazują one, że odkształcenia nie są trwałe, wymiary próbek po badaniu nie uległy zmianom. Odkształcenie przy maksymalnej dla maszyny sile ściskającej ma wartość  $\epsilon=0,81$  mm, co stanowi 8,3%.

## Wnioski

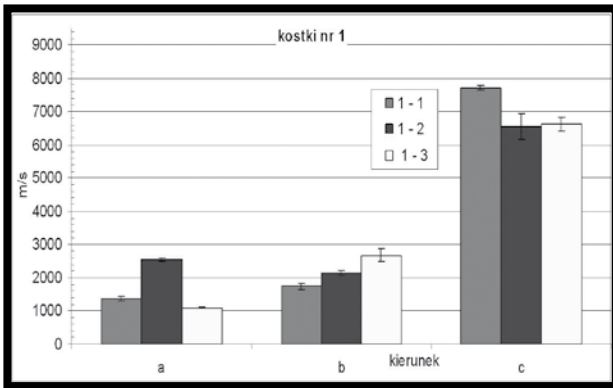
Otrzymane wyniki badań gęstości i porowatości otwartej dowodzą, że materiał jest niejednorodny, zawiera w swojej mikrostrukturze pustki, defekty na granicy faz włókno – osnowa. Badania ultradźwiękowe dowodzą dodatkowo braku ostrych granic przejścia pomiędzy warstwami, co jest charakterystyczne dla materiału gradientowego i jest dowodem na prawidłowo dobraną technikę wytwarzania (laminowanie).

Wyniki badań wytrzymałościowych pokazują przydatność tych materiałów jako wkładek dokręgosłupowych ze względu

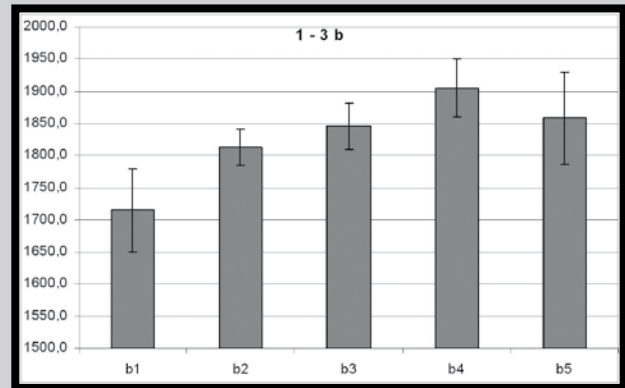
FIG. 2 and 3 show gradient system of samples and make proof of making less percentage participation of the fibres from left to right side (the samples were measured from upper layer). Less column for sample b5 in ratio to b4 include in limit of the mistake. As to compare values  $\epsilon$  received by usage of the method of computer's simulation it was made strain's characteristics. These show that strains are not durable, dimensions of the samples after investigation were not changed. The deformation for maximum of compressing force with the machine has the value  $\epsilon=0,81$  mm, what is 8,3 percentage.

## Conclusions

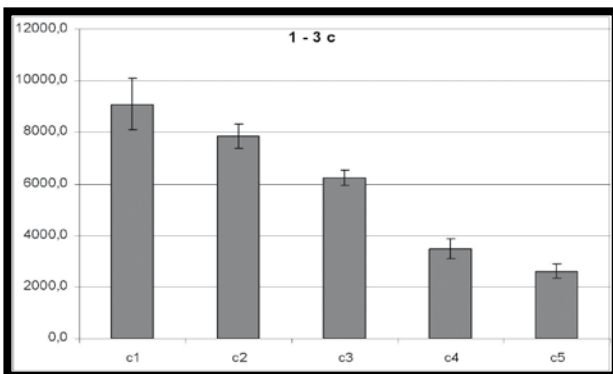
Obtained the results of the density and open porosity show that material is inhomogeneous and contained in its microstructure the voids, defects on interface fibre – matrix. Ultrasonic measurements show there aren't sharp phase boundary, that is the proof on correct selection of production engineering (laminating). The results of the strength's measurements show usability of these materials as spine pad, because of its high strength and strain including in limits for cervical spine: 7,1 to 89%, for interval of ages 40–79 years [5]. Investigated by using of testing machine value of Young's modulus of investigated materials include to the interval assumed for spongy bone and fibroform ring



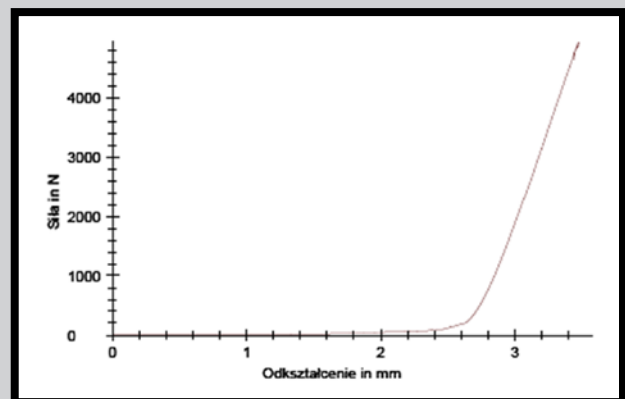
**WYKRES 1.** Wyniki pomiarów ultradźwiękowych dla serii 1.  
**DIAGRAM 1.** The results of ultrasonic measurements for serie 1.



**WYKRES 2.** Wyniki pomiarów ultradźwiękowych na poszczególnych warstwach materiału, dla kierunku b, dla badanej serii.  
**DIAGRAM 2.** The results of ultrasonic measurements on each layer of material, for b direction, for investigated serie.



**WYKRES 3.** Wyniki pomiarów ultradźwiękowych na poszczególnych warstwach materiału, dla kierunku c, dla badanej serii.  
**DIAGRAM 3.** The results of ultrasonic measurements on each layer of material, for c direction, for investigated serie.



**WYKRES 4.** Charakterystyka odkształceniowa materiału z badanej serii.  
**DIAGRAM 4.** Strain's characteristic of material from experimental series.

na ich wysoką wytrzymałość i odkształcalność mieszczącą się w podawanym przez autorów zakresie dla kręgosłupa sztywnego człowieka, tj. od 7,1–89%, dla przedziału wiekowego 40–79 lat [5].

Wyznaczona doświadczalnie przy użyciu maszyny wytrzymałościowej wartość modułu sztywności badanych materiałów mieści się w zakresie przyjmowanym dla kości gąbczastej i pierścienia włóknistego krążka międzykręgowego, co potwierdza przydatność kompozytu jako implantu z punktu widzenia biomechanicznego. Konieczny warunek biomechaniczny dopasowania modułów Younga kości i implantu został spełniony dla kompozytu PSU/CF 1D.

of intervertebral disc, it authenticates usability of composite as implant from biomechanical point of view. Biomechanical necessary condition of matching Young's modulus of bone and implant was satisfied for PSU/CF 1D.

## Piśmiennictwo

- [1] R. Będziński, Biomechanika inżynierska, zagadnienia wybrane, Wrocław 1997r.
- [2] M. Łopaciński, Ceramiczne materiały gradientowe odporne na udar, pękanie i ścieranie, Rozprawa Doktorska, Kraków 2002r.
- [3] The Biomechanics of Trauma, Ed. A. M. Nahum, J. Melvin, Norwalk, 1985r.

## References

- [4] Tylman D. Patomechanika bocznych skrzywień kręgosłupa, Warszawa 1972r.
- [5] Yamada H., Strength of Biological Materials. Ed. R. E. Krieger, New York 1973.

# MODYFIKACJA WAPNIEM I FOSFOREM WARSTEWKI TLENKOWEJ NA STOPIE Ti6Al7Nb

WOJCIECH SIMKA<sup>1</sup>, GINTER NAWRAT<sup>1</sup>, ALEKSANDER IWANIAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA ŚLĄSKA  
KATEDRA CHEMII I TECHNOLOGII NIEORGANICZNEJ,  
UL. B. KRZYWOUSTEGO 6, 44-100 GLIWICE, POLSKA

<sup>2</sup> POLITECHNIKA ŚLĄSKA,  
KATEDRA NAUKI O MATERIAŁACH  
UL. KRASIŃSKIEGO 8, 40-019 KATOWICE, POLSKA

## Streszczenie

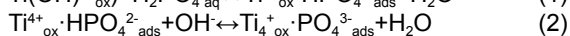
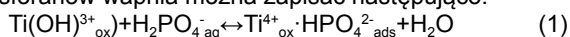
Przeprowadzono badania mające na celu określenie możliwości wbudowania wapnia i fosforu w warstewkę tlenkową na stopie implantacyjnym Ti6Al7Nb w trakcie procesu pasywacji anodowej oraz określenie odporności na korozję tak zmodyfikowanego stopu w fizjologicznym roztworze Tyrode'a. Stwierdzono, że przy napięciu pasywacji wynoszącym  $U=100V$ , w warstewkę pasywną wbudowuje się jedynie fosfor. Zastosowanie wyższego napięcia ( $U=150V$ ) powoduje utlenianie jarzeniowe powierzchni, prowadzące do otrzymania struktury porowatej o zwiększonej zawartości wapnia i fosforu. Proces pasywacji anodowej połączony z implantacją wapnia i fosforu w warstewkę tlenkową powoduje zwiększenie odporności na korozję stopu Ti6Al7Nb w roztworze fizjologicznym Tyrode'a.

**Słowa kluczowe:** Ti6Al7Nb alloy, spark anodization, Ca and P implantation

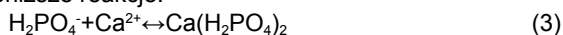
[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 16-20]

## Wstęp

Tytan i jego stopy są stosowane jako implanty dentystryczne i ortopedyczne ze względu na ich doskonałe właściwości korozyjne oraz biokompatybilność. Bezpośredni zrost tytanu z kością nie jest jednak możliwy ze względu na brak odpowiedniej aktywności chemicznej powierzchni implantu. W związku z tym konieczne jest stosowanie odpowiedniej modyfikacji powierzchniowej takiego implantu w celu zwiększenia jego bioaktywności [1-4]. Implantacja jonów wapnia i fosforu w warstewkę pasywną podwyższa bioaktywność tytanu oraz zwiększa jego odporność korozyjną. Badania in vivo wykazały korzystny wpływ implantacji jonów wapnia na tworzenie się tkanki kostnej. Ilość tworzącej się tkanki była znaczenie większa na powierzchni implantowanej jonami wapnia niż na powierzchni nieimplantowanej. Badania tytanu, które były prowadzone w środowisku symulującym płyn ustrojowy wykazały, że na jego powierzchni tworzy się samorzutnie warstwa fosforanów wapnia, o grubości kilku nanometrów. W pierwszym etapie tworzenia się fosforanu wapnia na powierzchni tytanu zachodzi adsorpcja jonów fosforanowych z roztworu, a następnie zaadsorbowane jony fosforanowe wiążą jony wapnia. Pierwszy etap tworzenia się fosforanów wapnia można zapisać następująco:



W drugim etapie tworzenia fosforanów mogą zachodzić poniższe reakcje:



# MODIFICATION OF OXIDE LAYER BY CALCIUM AND PHOSPHORUS ON Ti6Al7Nb ALLOY

WOJCIECH SIMKA<sup>1</sup>, GINTER NAWRAT<sup>1</sup>, ALEKSANDER IWANIAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF INORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,  
6, B. KRZYWOUSTEGO STR., 44-100 GLIWICE, POLAND

<sup>2</sup> SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE,  
8, KRASIŃSKIEGO STR., 40-019 KATOWICE, POLAND

## Abstract

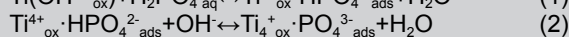
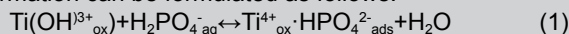
The research was undertaken in order to determine the possibility of calcium and phosphorous incorporation into the oxide layer on Ti6Al7Nb implant alloy during anodic passivation process and determine the corrosion resistance of such a modified alloy in the physiological Tyrode's solution. It was stated that at the passivation voltage of  $U=100V$ , only phosphorous builds itself into the passive layer. Application of higher voltage ( $U=150V$ ) causes surface glowing oxidation leading to porous structure of increased calcium and phosphorous content. The anodic passivation process combined with calcium and phosphorous implantation into oxide layer leads to improvement of corrosion resistance of Ti6Al7Nb alloy in the physiological Tyrode's solution.

**Keywords:** Ti6Al7Nb alloy, spark anodization, Ca and P implantation

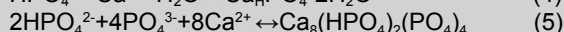
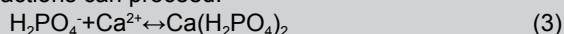
[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 16-20]

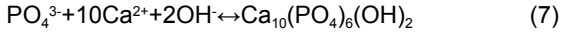
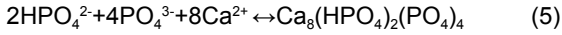
## Introduction

Titanium and its alloys are applied as dental and orthopedic implants because of their excellent corrosive properties and biological compatibility. However, direct integration of titanium with bone is not possible due to a lack of proper chemical activity of the implant surface. Therefore, it is necessary to apply proper surface modification of the said implant to improve its bioactivity [1-4]. Calcium and phosphorous ion implantation into the passive layer increases bioactivity of titanium and improves its corrosion resistance. In vivo examinations have revealed the advantageous influence of calcium ions implantation onto osseous tissue formation. Quantity of formed tissue was considerably greater on the calcium ions implanted surface than on the non-implanted one. Examination of titanium, which was carried out at the body fluid simulating environment, revealed that a layer of calcium phosphates with a several nanometer in thickness forms spontaneously on its surface. At the first stage of calcium phosphate formation on the titanium surface, the adsorption of phosphate ions from solution takes place, and then the adsorbed phosphate ions bind the calcium ions. The first stage of calcium phosphate formation can be formulated as follows:



At the second stage of phosphates formation the following reactions can proceed:





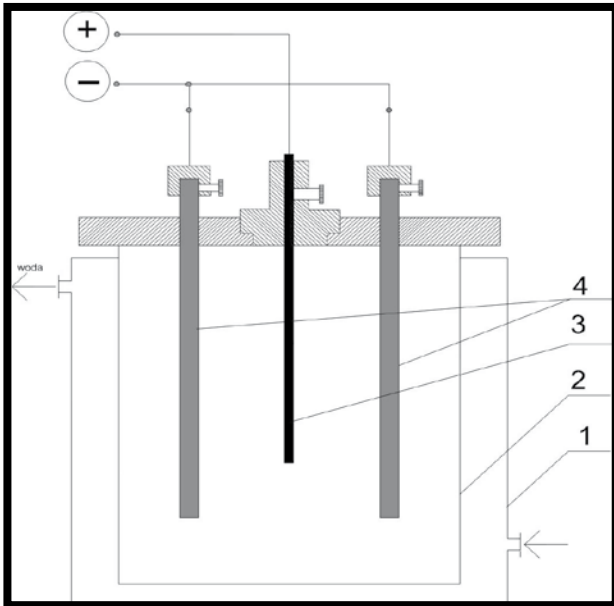
Wapń i fosfor mogą być wbudowywane w warstewkę tlenkową na tytanie między innymi w trakcie procesu pasywacji anodowej w odpowiednim elektrolicie. Tak zmodyfikowana warstewka po obróbce alkalicznej i hydrotermicznej może przekształcić się w bioaktywny hydroksyapatyt [5-9].

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości implantacji wapnia i fosforu w warstewkę tlenkową na stopie Ti6Al7Nb oraz określenie odporności korozyjnej tak zmodyfikowanej warstewki w fizjologicznym roztworze Tyrode'a.

## Materiał do badań i metodyka

Badaniom poddano stop tytanu Ti6Al7Nb w postaci pręta o średnicy 5 mm i długości 4 cm. Skład chemiczny stopu podano w TABELI 1.

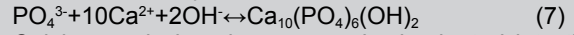
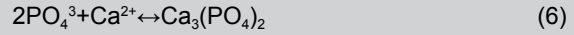
Przed procesem pasywacji próbki szlifowano papierem ściernym o uziarnieniu 320 i 600, a następnie trawiono. Trawienie próbek prowadzono w naczyniu wykonanym z polipropylenu w kąpeli zawierającej  $\text{NH}_4\text{F}$  i  $\text{H}_2\text{SO}_4$  w czasie 10 minut. Część próbek przed procesem pasywacji anodowej poddano procesowi polerowania elektrolitycznego w kąpeli zawierającej kwas siarkowy (VI), glikol etylenowy i fluorek amonu. Proces pasywacji anodowej prowadzono w elektrolizerze przedstawionym na RYSUNKU 1. Proces ten prowadzono w roztworze kwasu fosforowego (V) (50%obj.) z dodatkiem  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20g/dm<sup>3</sup>).



**RYS. 1.** Schemat elektrolizera do procesu pasywacji anodowej: (1 - płaszcz wodny połączony z termostatem, 2 - elektrolizer, 3 - anoda (pasywowana próbka), 4 - katody).

**FIG. 1.** Scheme of the electrolyser for anodic passivation process; (1 - water jacket connected with thermostat, 2 - electrolyser, 3 - anode (passivated sample), 4 - cathodes).

Parametry procesu pasywacji przedstawiono w TABELI 2. Wybrane próbki po procesach szlifowania, trawienia, polerowania i pasywacji anodowej poddano ocenie jakości i analizie chemicznej powierzchni oraz badaniom odporności na korozję metodą potencjodynamiczną w roztworze Tyrode'a. Badania strukturalne oraz skład chemiczny warstwy wierzchniej wykonano za pomocą mikroskopu skaningowego Hitachi S-3400N wyposażonego w systemem



Calcium and phosphorous can be implanted into the oxide layer on titanium, among other things, during the process of anodic passivation in proper electrolyte. The layer modified in such a way may convert into bioactive HAp after alkaline and hydrothermal treatment [5-9].

The aim of this research was to determine the possibilities of calcium and phosphorous incorporation into the oxide layer on Ti6Al7Nb alloy and determination of corrosion resistance of so modified alloy in the physiological Tyrode's solution.

## Material to tests and methodology

Ti6Al7Nb titanium alloy in the form of the rod of 5 mm in diameter and 4 cm in length was subject to tests. Chemical composition of the alloy is specified in TABLE 1.

**TABELA 1.** Skład chemiczny stopu Ti6Al7Nb użytego do badań.

**TABLE 1.** Technological composition of Ti6Al7Nb alloy used in the study.

Pierwiastek Chemical element	Al	Nb	Ta	Fe	C	N	H	O	Ti
Stężenie masowe Wright [%]	5,99	7	0,35	0,08	0,04	0,01	0,002	0,11	reszta completely

Before the passivation process the samples were ground with abrasive paper of 320 and 600 grain size distribution, and pickled thereafter. Samples pickling was carried out in a vessel made from polypropylene and bath containing  $\text{NH}_4\text{F}$  and  $\text{H}_2\text{SO}_4$  for 10 minutes. A part of samples before anodic passivation was subject to electrolytic polishing in the bath containing sulphuric (VI) acid and ethylene glycol and ammonium fluoride. The anodic passivation process was carried out in the electrolyser shown in the FIGURE 1. The process was performed in the solution of phosphoric (V) acid (50% vol.) with addition of  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20g/dm<sup>3</sup>).

The parameters of the passivation process are shown in TABLE 2. The selected samples after grinding, pickling, polishing and anodic passivation processes were subject to quality assessment and chemical analysis of surface as well as corrosion resistance tests by potentiodynamic method in

**TABELA 2.** Parametry procesu pasywacji elektrochemicznej.

**TABLE 2.** Parameters of electrochemical passivation process.

Nr Próbki No. of sample	Rodzaj próbki Kind of sample	Czas obróbki Time of processing [min]	Napięcie Voltage [V]
1	Trawiona etching	5	100
2	Trawiona etching	1	150
3	trawiona i polerowana etching, polishing	5	100
4	trawiona i polerowana etching, polishing	1	150



mikroanalizy rentgenowskiej (EDS) firmy Thermo Noran stosując napięcie wzbudzenia katody w zakresie  $U=15\text{--}25\text{kV}$ . Natomiast badania chropowatości powierzchni przeprowadzono przy pomocy profilometru Mitutoyo SJ 301. W celu określenia odporności korozyjnej przeprowadzono badania potencjodynamiczne, rejestrując krzywe polaryzacji anodowej dla każdej próbki. Badania przeprowadzono w roztworze Tyrode'a o składzie:  $\text{NaCl}-8\text{g/dm}^3$ ,  $\text{CaCl}_2-0,2\text{g/dm}^3$ ,  $\text{KCl}-0,2\text{ g/dm}^3$ ,  $\text{MgCl}_2-0,05\text{ g/dm}^3$ ,  $\text{NaHCO}_3-1\text{g/dm}^3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4-0,05\text{ g/dm}^3$ . Na podstawie tych badań określono potencjał stacjonarny  $E$  [mV], zależność  $i=f(E)$  w celu wyznaczenia wartości gęstości prądu korozyjnego  $I_{\text{kor}}$  [ $\text{A/cm}^2$ ], oporu polaryzacji  $R_p$  [ $\Omega/\text{cm}^2$ ] oraz liniowej szybkości korozji  $V_p$  [mm/rok], która charakteryzuje zużycie korozyjne materiału. Badania te zostały wykonane za pomocą systemu pomiarowego AutoLab składającego się z potencjostatu PGSTAT30 współpracującego z oprogramowaniem komputerowym GPES. Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową, natomiast elektrodę pomocniczą stanowiła elektroda platynowa (Pt).

## Wyniki badań i ich omówienie

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że powierzchnia próbek po procesie trawienia została wygładzona. Średni współczynnik chropowatości ( $R_a$ ) uległ obniżeniu z wartości  $0,44\text{ }\mu\text{m}$  do  $0,13\text{ }\mu\text{m}$  (TAB. 4). Polerowanie elektrolityczne wytrawionych próbek praktycznie nie wpływa na jakość uzyskanej powierzchni. Na podstawie mikroanalizy chemicznej stwierdzono, że po procesie trawienia zawartość glinu na powierzchni stopu uległa obniżeniu o ok. 1%. W trakcie procesu polerowania elektrolitycznego została usunięta warstwa uboższa w glin, w związku z czym skład chemiczny powierzchni stał się zbliżony do składu stopu poddanego tylko szlifowaniu.

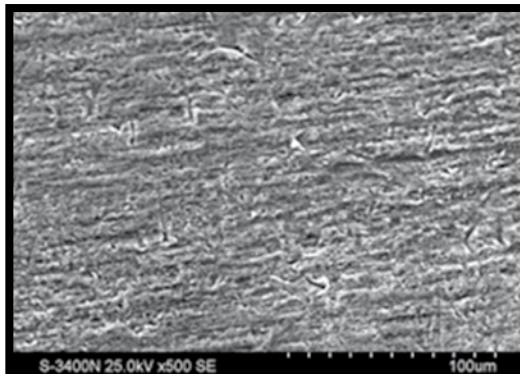
Na podstawie analizy wyników uzyskanych w trakcie pasywacji w kąpeli zawierającej  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  stwierdzono, że powierzchnia próbek uległa rozwinięciu (RYS. 2, 4, TAB. 4). Próbki trawione, pasywane przy napięciu  $U=100\text{V}$ , charakteryzowały się średnim współczynnikiem chropowatości ( $R_a$ ) wyższym o ok.  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  od próbek polerowanych (TAB. 4). Powierzchnia próbek pasywana przy napięciu  $U=100\text{V}$  uległa wzbogaceniu jedynie w fosfor, pomimo zawartości w kąpeli jonów wapnia (RYS. 3). W zależności od rodzaju przygotowania powierzchni próbek zawartość fosforu wynosiła od ok.  $0,7$  do ok.  $1\%$ . Zawartość niobu w warstwie pasywnej była zbliżona i wynosiła ok.  $9\%$ . Zawartość glinu była natomiast niższa w przypadku próbek trawionych o ok.  $2$  i w stosunku do próbek polerowanych.

the Tyrode's solution. Examination of surface condition was carried out with using scanning microscope Hitachi S-3400N with an X-ray microanalysis system (EDS) Thermo Noran at voltage cathode  $15\text{--}25\text{kV}$ , while the surface roughness tests were carried out with using SJ 301 Mitutoyo profile measurement gauge. In order to determine the corrosion resistance the potentiodynamic tests were performed with recording of anodic polarization curves for each sample. The tests were performed in the Tyrode's solution with the following contents:  $\text{NaCl}-8\text{g/dm}^3$ ,  $\text{CaCl}_2-0,2\text{g/dm}^3$ ,  $\text{KCl}-0,2\text{g/dm}^3$ ,  $\text{MgCl}_2-0,05\text{g/dm}^3$ ,  $\text{NaHCO}_3-1\text{g/dm}^3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4-0,05\text{g/dm}^3$ . Basing on those tests it was determined the stationary potential  $E$  [mV],  $i=f(E)$  relation to determine the corrosion current density value  $I_{\text{kor}}$  [ $\text{A/cm}^2$ ], polarization resistance  $R_p$  [ $\Omega/\text{cm}^2$ ] and linear speed of corrosion  $V_p$  [mm/year] that characterizes the corrosive consumption of material. Those tests were made by means of the AutoLab measuring system, composed of PGSTAT30 potentiostat co-operating with GPES computer software. A saturated calomel electrode was applied as the reference electrode and platinum electrode (Pt) as the auxiliary electrode.

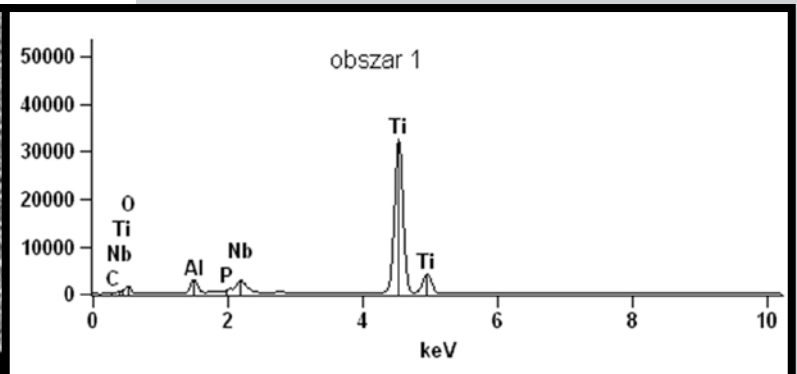
## Results and discussion

On the basis of the obtained results it was stated that the sample surface after pickling was smoothed. The average roughness coefficient diminished from  $0,44\text{ }\mu\text{m}$  to  $0,13\text{ }\mu\text{m}$  (TAB. 4). Electrolytic polishing of pickled samples does not affect the quality of obtained surface really. On the basis of chemical microanalysis it was stated that the aluminum content on the alloy surface after pickling drops by ca. 1%. During the electrolytic polishing process the layer impoverished with aluminum was removed, thereby the chemical composition of surface became similar to the composition of the alloy subjected to grinding only.

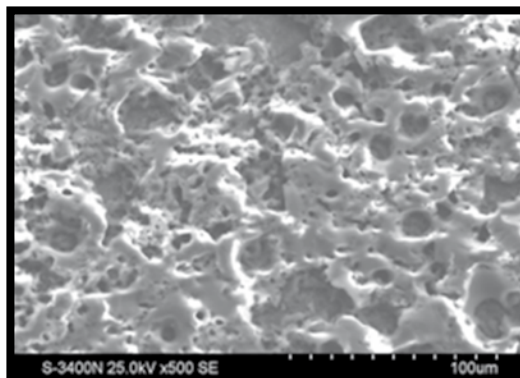
On the grounds of the analysis results obtained during passivation in the bath containing  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  it was stated that the sample surface subjected to development (FIG. 2, 4, TAB. 4). The pickled samples, passivated at  $U=100\text{V}$  were characterized by the average roughness coefficient greater by ca.  $0,5\text{ }\mu\text{m}$  than the polished samples (TAB. 4). The passivated surface of samples at  $U=100\text{V}$  enriched with phosphorous only, despite of calcium ions content in the bath (FIG. 3). Depending on the type of sample surface preparation the phosphorous content amounted from ca.  $0,7$  to ca.  $1\%$ . The content of niobium in the passive layer was similar and amounted to ca.  $9\%$ . However, the aluminum content was lower in case of pickled samples by ca.  $2$  and in relation to polished samples, as well.



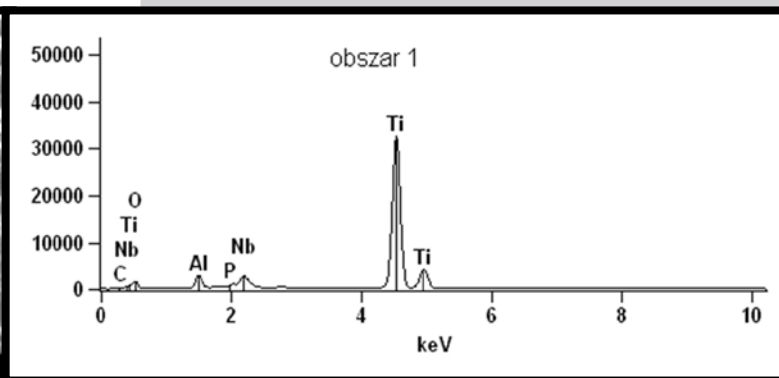
RYS. 2. Obraz powierzchni próbki nr 1 po pasywacji przy napięciu  $U=100\text{V}$  (SEM, 1000x).  
FIG. 2. Surface of sample no. 1 after passivation at  $U=100\text{V}$  (SEM; 1000x).



RYS. 3. Widmo promieniowania rentgenowskiego uzyskanego z powierzchni próbki nr 1 (przy napięciu pasywacji  $U=100\text{V}$ ).  
FIG. 3. X-ray spectrum from the surface of sample no. 1 (passivation parameters:  $U=100\text{V}$ ).



RYS. 4. Obraz powierzchni próbki nr 2 po pasywacji przy napięciu  $U=150V$  (SEM; 500x).  
FIG. 4. Surface of sample no. 2 after passivation at  $U=150V$  (SEM; 500x).



RYS. 5. Widmo promieniowania rentgenowskiego uzyskanego z powierzchni próbki nr 2 (przy napięciu pasywacji  $U=150V$ ).  
FIG. 5. X-ray spectrum from the surface of sample no. 2 (passivation parameters:  $U=150V$ ).

TABELA 3. Udziały wagowe pierwiastków na powierzchni próbek po modyfikacji.

TABLE 3. Mass fractions of elements on surface of samples after modification.

Nr próbki No. of sample	Zawartość wagowa pierwiastka Weight of chemical element [%]				
	Al	Nb	Ti	Ca	P
1	4,94	8,74	85,58	-	0,73
2	2,72	7,68	51,40	4,66	33,55
3	6,65	9,03	83,26	-	1,07
4	4,65	7,55	84,46	0,15	3,20

Pasywacja przy napięciu  $U=150V$  prowadziła do istotnego rozwinięcia powierzchni na skutek przebijania tworzącej się warstewki tlenkowej (RYS. 4). Powierzchnia próbek trawionych charakteryzowała się dużo większymi porami niż próbek polerowanych. Średni współczynnik chropowatości wynosił odpowiednio 0,99 i 0,60  $\mu m$ . W trakcie tego procesu nastąpiło wbudowanie wapnia i fosforu w warstewkę tlenkową (RYS. 4). W przypadku próbek trawionych średnia zawartość wapnia i fosforu wynosiła odpowiednio ok. 4,5 i 33%, natomiast w przypadku próbek polerowanych 0,15 i 3,20%.

Na podstawie badań elektrochemicznych odporności na korozję w roztworze fizjologicznym Tyrode'a stwierdzono, że trawienie próbek poprawia ich odporność na korozję. Potencjał korozyjny uległ zwiększeniu z ok. -1,2V do -1,1V, szybkość korozji uległa natomiast obniżeniu z ok.  $1,6 \cdot 10^{-1}$  mm/rok do ok.  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mm/rok. Dalszy wzrost odporności na korozję w fizjologicznym roztworze Tyrode'a nastąpił po zastosowaniu procesu polerowania elektrolitycznego. Potencjał korozyjny uległ zwiększeniu do ok. -0,8V, opór polaryzacyjny do wartości  $2,5 \cdot 10^4 \Omega/cm^2$ , szybkość korozji uległa natomiast obniżeniu do ok.  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mm/rok. Zwiększenie odporności korozyjnej stopu Ti6Al4V po trawieniu i następnie polerowaniu elektrochemicznym związane jest z wygładzeniem i ujednorodnieniem powierzchni próbek.

Próbki poddane procesowi pasywacji anodowej charakteryzowały się większą odpornością na korozję niż próbki szlifowane (TAB. 5 i 6). Potencjał korozyjny uległ zwiększeniu z ok. -1,20V (próbka szlifowana) do -1,0 (próbki pasywowane), szybkość korozji próbek pasywowanych ( $1,1 \cdot 10^{-2} \pm 4,2 \cdot 10^{-2}$  mm/rok) uległa natomiast obniżeniu w stosunku do wartości uzyskanej dla próbki szlifowanej ( $1,6 \cdot 10^{-1}$  mm/rok). Analizując uzyskane wyniki odporności korozyjnej stwierdzono, że odporność korozyjna próbek pasywowanych przy napięciu  $U=150V$  była niższa niż odporność korozyjna próbek pasywowanych przy napięciu  $U=100V$ . Fakt ten związany jest z tym, że powierzchnia próbek modyfikowanych przy wyższym

TABELA 4. Wpływ parametrów obróbki powierzchniowej na średni współczynnik chropowatości powierzchni próbek.

TABLE 4. Influence of surface treatment parameters on the average roughness coefficient of sample surface.

Rodzaj próbki / numer próbki Kind of sample / No. of sample	Parametr $R_a$ Parameter $R_a$ [ $\mu m$ ]
szlifowana / grinding	0,44
szlifowana, trawiona / grinding, etching	0,13
szlifowana, trawiona, polerowana grinding, etching, polishing	0,13
1	0,24
2	0,99
3	0,75
4	0,60

Passivation at  $U=150V$  lead to significant surface development in result of punching the formed oxide layer (FIG. 4). The surface of pickled samples was characterized by considerably greater pores than in case of polished samples. The average roughness coefficient amounted 0,99 and 0,60  $\mu m$  respectively. During that process calcium and phosphorous building into oxide layer took place (FIG. 4). In case of pickled samples the average contents of calcium and phosphorous amounted to 4,5 and 33% respectively, however in case of polished samples those values were equal to 0,15 and 3,20% respectively.

On the basis of electrochemical corrosion resistance examinations in the physiological Tyrode's solution it was stated that samples pickling improves their resistance to corrosion. The corrosion potential has grown from ca. -1,2V to -1,1V, however the corrosion rate has diminished from ca.  $1,6 \cdot 10^{-1}$  mm/year to ca.  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mm/year (TAB. 6). Further growth of corrosion resistance in the physiological Tyrode's solution took place after application of electrolytic polishing treatment. The corrosion potential has increased up to ca. -0,8V, polarization resistance to the value of  $2,5 \cdot 10^4 \Omega/cm^2$ , however the corrosion rate diminished to ca.  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mm/year. The growth of corrosion resistance of Ti6Al4V alloy after pickling with the next electrochemical polishing is connected with smoothing and homogenization of sample surface.

The samples subjected to anodic passivation were characterized by greater corrosion resistance than the ground samples (TAB. 5 and 6.). The corrosion potential increased from ca. 1,20V (ground sample) to -1,0 (passivated samples), corrosion rate of passivated samples ( $1,1 \cdot 10^{-2} \pm 4,2 \cdot 10^{-2}$  mm/year) diminished in relation to the value obtained for the ground sample ( $1,6 \cdot 10^{-1}$  mm/year). At the analysis of the results of corrosion resistance it was stated that the

**TABELA 5. Wyniki badań odporności korozyjnej próbek w roztworze Tyrode'a nie poddanych pasywacji.**  
**TABLE 5. Results of corrosion resistance tests in the Tyrode's solution samples not subjected to passivation.**

Rodzaj próbki Kind of sample	Parametr Parameter			
	E [V]	$I_{cor}$ [A/cm <sup>2</sup> ]	$R_p$ [Ω/cm <sup>2</sup> ]	$V_p$ [mm/rok]
szlifowana grinding	-1,231	$1,844 \cdot 10^{-5}$	$1,907 \cdot 10^4$	$1,658 \cdot 10^{-1}$
szlifowana, trawiona grinding, etching	-1,114	$9,361 \cdot 10^{-6}$	$1,711 \cdot 10^4$	$8,418 \cdot 10^{-2}$
szlifowana, trawiona, polerowana grinding, etching, polishing	-0,793	$1,438 \cdot 10^{-6}$	$2,458 \cdot 10^4$	$1,293 \cdot 10^{-2}$

napięciu jest bardzo porowata, a zatem jest niejednorodna pod względem elektrochemicznym. Taka niejednorodność powierzchni może być przyczyną powstawania mikroogniw korozyjnych.

## Podsumowanie

Przeprowadzono badania mające na celu określenie możliwości wbudowania wapnia i fosforu w warstwę tlenkową na stopie implantacyjnym Ti6Al7Nb w trakcie procesu pasywacji anodowej oraz określenie odporności na korozję tak zmodyfikowanego stopu w fizjologicznym roztworze Tyrode'a.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że parametry procesu pasywacji anodowej mają istotny wpływ na morfologię i skład chemiczny uzyskanych warstw pasywnych. Stwierdzono, że przy napięciu  $U=100V$ , w warstwę pasywną wbudowuje się jedynie fosfor. Zastosowanie wyższego napięcia ( $U=150V$ ) powoduje utlenianie jądrowe powierzchni, prowadzące do otrzymania struktury porowatej. W trakcie pasywacji przy tym napięciu następuje istotne wzbogacenie warstwy pasywnej w wapń i fosfor. Zawartość tych pierwiastków w warstwie tlenkowej oraz jej morfologia w dużej mierze zależą od składu chemicznego zastosowanej kąpieli.

Stwierdzono, że proces pasywacji anodowej połączony z implantacją wapnia i fosforu w warstwę tlenkową powoduje zwiększenie odporności na korozję stopu Ti6Al7Nb w roztworze fizjologicznym Tyrode'a. Odporność korozyjna próbek pasywanych przy napięciu  $U=150V$  jest niższa niż próbek pasywanych przy napięciu  $U=100V$ , co jest związane z morfologią uzyskanej warstwy pasywnej.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007-2009 jako projekt badawczy rozwojowy Nr R15 013 03.

## Piśmiennictwo

- [1] Y.J. Park, K.H. Shin, H.J. Song, Appl Surf Sci, 253 (2007) 6013.
- [2] D. Krupa, J. Baszkiewicz, J.A. Kozubowski, J. Mizera, A. Barcz, J.W. Sobczak, A. Biliński, B. Rajchel, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 617.
- [3] E. Czarnowska, D. Krupa, T. Wierzchoń, Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2004.
- [4] J. Łaskawiec, R. Michalik R., Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002.

**TABELA 6. Wyniki badań odporności korozyjnej próbek w roztworze Tyrode'a poddanych pasywacji.**  
**TABELA 6. Results of corrosion resistance tests in the Tyrode's solution samples subjected to passivation.**

Nr próbki No. of sample	Parametr Parameter			
	E [V]	$I_{cor}$ [A/cm <sup>2</sup> ]	$R_p$ [Ω/cm <sup>2</sup> ]	$V_p$ [mm/rok]
1	-0,974	$4,693 \cdot 10^{-6}$	$8,832 \cdot 10^4$	$1,793 \cdot 10^{-2}$
2	-0,916	$1,994 \cdot 10^{-6}$	$1,14 \cdot 10^5$	$4,22 \cdot 10^{-2}$
3	-1,007	$2,44 \cdot 10^{-6}$	$7,42 \cdot 10^4$	$2,194 \cdot 10^{-2}$
4	-0,848	$1,119 \cdot 10^{-6}$	$1,734 \cdot 10^5$	$1,006 \cdot 10^{-2}$

corrosion resistance of the samples passivated at  $U=150V$  was lower than the corrosion resistance of the samples passivated at  $U=100V$ . (TAB. 6). It is connected with the fact that the surface of the samples modified at higher voltage is very porous and thereby electrochemically heterogeneous. Such a heterogeneity of surface can lead to corrosion cells formation.

## Summary

The research was undertaken in order to determine the possibility of calcium and phosphorous incorporation into the oxide layer on Ti6Al7Nb implant alloy during anodic passivation process and determine the corrosion resistance of such a modified alloy in the physiological Tyrode's solution.

On the basis of obtained results it was stated that the parameters of anodic passivation process considerably affect morphology and chemical composition of the obtained passive layers. It was stated at  $U=100V$  only phosphorous comes into the passive layer. Application of a higher voltage ( $U=150V$ ) causes gluing oxidation of surface leading to porous structure. During passivation at such a voltage an important enrichment of the passive layer with calcium and phosphorous takes place. Contents of those elements in the oxide layer as well as its morphology are conditional on the chemical composition of the applied bath to the great extent.

It was stated that the anodic passivation process combined with calcium and phosphorous implantation into the oxide layer lead to the growth of corrosion resistance of Ti6Al7Nb alloy in the physiological Tyrode's solution. The corrosion resistance of the samples passivated at  $U=150V$  is lower than that for the samples passivated at the voltage of  $U=100V$  that is connected with morphology of the obtained passive layer.

## Acknowledgements

This work was supported by Polish Ministry Science and Higher Education (grant No R15 013 03 in years 2007-2009).

## References

- [5] X. Zhu, K.H. Kim, Y. Jeong, Biomaterials, 22 (2001) 2199.
- [6] H. Ishizawa, M. Ogino, J Biomed Mater Res, 29 (1995) 65.
- [7] Zhu X., Kim K.H., Jeong Y., (2001) Biomaterials 22: 2199.
- [8] Oh H.J., Lee J.H., Kim Y.J., Suh S.J., Lee J.H., Chi Ch.S., (2008) Mater Chem Phys 109.
- [9] Park J.H., Lee Y.K., Kim K.M., Kim K.N., (2005) Surf Coat Technol 195: 252.

# OCENA WPŁYWU KOMPOZYTÓW P(LLA/GA) Z WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI ORAZ P(LLA/GA) Z FOSFORANEM TRÓJWAPNIOWYM NA PROCES GOJENIA TKANKI KOSTNEJ - BADANIA IN VIVO NA POSTAWIE WYBRANYCH PARAMETRÓW

T. CIEŚLIK<sup>1</sup>, M. ADWENT<sup>1\*</sup>, J. CHŁOPEK<sup>2</sup>,  
A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>2</sup>, M. CIEŚLIK<sup>3</sup>, J. MAJCHERCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII CZASZKOWO-SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ ŚUM W KATOWICACH

<sup>2</sup>KATEDRA BIOMATERIAŁÓW AGH W KRAKOWIE

<sup>3</sup>KATEDRA I ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO ŚUM W KATOWICACH

\* E-MAIL: MADWENT@SUM.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 21-24]

## Wprowadzenie

Właściwości biologiczne kopolimerów kwasu mlekowego i glikolowego powodują ciągłe zainteresowanie tymi materiałami i wdrażanie ich do zastosowań medycznych. Są one stosowane w chirurgii do zespalania złamań kości, wypełniania ubytków kostnych po resekcjach zmian patologicznych, zaopatrywania uszkodzeń narządów wewnętrznych. Stosowane są również jako materiał szewny, jako nośniki leków oraz jako materiały do hodowli komórkowych. W chirurgii szczękowo-twarzowej materiały te używane są do zespalania złamań kości części twarzowej czaszki. Dzięki właściwościom termoplastycznym mogą być swobodnie kształtowane i dostosowywane do anatomicznych krzywizn kości. Ich stopniowa resorpcja, a co za tym idzie zmniejszająca się w czasie odporność mechaniczna pozwala na płynne przejmowanie obciążeń przez nowo regenerującą się tkankę kostną [1,2,3]. Resorbują się w przeciągu 2 lat tworząc proste hydroksykwasy, które są włączane w cykl Krebsa i rozkładane do H<sub>2</sub>O i CO<sub>2</sub> [3]. Niestety stosunkowo mała odporność mechaniczna kopolimerów ogranicza ich zastosowanie do miejsc w których występują niewielkie obciążenia mechaniczne. Sposobem na poprawę ich właściwości fizycznych jest tworzenie kompozytów z różnego rodzaju wypełniaczami poprawiającymi ich właściwości biologiczne i mechaniczne [2]. Przykładem mogą być włókna węglowe, włókna polimerowe czy fosforan trójwapniowy.

## Materiał i metody

W pracy oceniano i porównano gojenie się ubytków kostnych wypełnionych kompozytami kopolimer laktyd/glikolid z włóknem węglowym (CF), laktyd/glikolid z fosforanem trójwapniowym (TCP) i porównano je z ubytkami kostnymi wypełnionymi skrzepami krwi. Badania przeprowadzono na grupie 84 królików nowozelandzkich. W każdej grupie było 28 zwierząt, w równej liczbie dojrzałe samce i samice. Wszystkie zabiegi przeprowadzono w Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Etycznej do Badań na Zwierzętach. W przeprowadzonych badaniach kompozyty składały się z kopolimeru laktydu i glikolidu P(LLA/GA): 84% laktydu i 16% glikolidu (Mn=85000 Da,

# THE INFLUENCE OF P(LLA/GA) WITH CARBON FIBERS AND P(LLA/GA) WITH TRICALCIUM PHOSPHATE COMPOSITE MATERIALS ON THE PROCESS OF BONE HEALING - IN VIVO STUDIES BASED ON THE CHOSEN PARAMETERS

T. CIEŚLIK<sup>1</sup>, M. ADWENT<sup>1\*</sup>, J. CHŁOPEK<sup>2</sup>,  
A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>2</sup>, M. CIEŚLIK<sup>3</sup>, J. MAJCHERCZYK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT AND CLINIC OF CRANIOMAXILLOFACIAL SURGERY OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,

AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW

<sup>3</sup>DEPARTMENT AND SECTION OF DENTAL MATERIALS SCIENCE OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

\* E-MAIL: MADWENT@SUM.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 21-24]

## Introduction

Biological properties of lactide and glycolide copolymers increase the interests of these materials in medicine. These materials can be applied in traumatology as plates and screws fixing bone fractures, as bone defects regenerating materials for ex. after tumor resection or in general surgery. PGLA polymers are also used as surgical sutures, as drug carriers or as a substrate in cell cultures. In maxillofacial surgery copolymers are used in bone fractures as fixing elements. It is thermoplastic material and can be shaped to anatomical curves of the bone. It is gradually resorbed within time. Ingrowing new bone takes over the physiological loads [1,2,3]. Within two years copolymers are resorbed and the results of degradation are water and oxygen [3]. However low mechanical strength of copolymers limits their application to the areas that are not heavily loaded. There are additives like for example carbon fibers or tricalcium phosphate that can be mixed with PGLA copolymers improving their biological and mechanical properties [2].

## Material and methods

The aim of this study was evaluation of composites lactide/glycolide copolymers with carbon fibers, lactide/glycolide copolymers with tricalcium phosphate, compared to the bone defects filled with blood clot. Evaluation study was performed on the group of 84 New Zealand white rabbits. There were 28 animals in each group. All surgeries were performed in the Experimental Study Center of Medical University of Silesia. Copolymer was made of 84% of lactide and 16% of glycolide manufactured at the Center of Polymer Chemistry PAN in Zabrze, Poland [4]. The composites was made in the Faculty of Materials Science and Ceramics of AGH University of Science and Technology by addition of 15wt% of carbon fibers P(LLA/GA)+CF or 15wt% of tricalcium phosphate P(LLA/GA)+TCP [2]. Cylinder shape of the implants was made by injection moulding in the temperature of 180°C. The samples were cylinder shape with diameter of 3,2 mm. All surgeries were performed in general anesthesia with additional local injection of anesthetics. After the incision in the submandibular region left corpus of mandible was exposed.

Mw/Mn=2,1) wyprodukowanego w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu [4]. Kompozyt otrzymano przez dodatek 15% wag. nanocząstek fosforanu trójwapieniowego lub przez dodatek 15% wagowych krótkich włókien węglowych (CF): FT 300B (Torayca, Japan; fibre diameter  $d=7 \mu\text{m}$ ,  $\rho=1.76 \text{ g/cm}^3$ ,  $\sigma_r=3.2 \text{ GPa}$ ,  $E=235 \text{ GPa}$ ) [2]. Wszczępy o pożądanym kształcie otrzymano w Katedrze Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie metodą wtrysku w temperaturze  $180^\circ\text{C}$ . Wszczępy miały kształt walców o średnicy 3,2 mm. Zabiegi na zwierzętach przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym dożylnym z dodatkowym znieczuleniem miejscowym. Po nacięciu skóry i tkanki podskórnej docierano do trzonu żuchwy po stronie lewej. Po nawierceniu kości na dolnym brzegu żuchwy tuż za zębem siecznym a przed zębami trzonowymi wprowadzano badane walce kompozytowe. Walce docinano po wcześniejszym zmierzeniu głębokości nawierconego kanału kostnego. W grupie I wprowadzano kompozyty P(LLA/GA)+CF, w grupie II P(LLA/GA)+TCP. W grupie III kanał pozostawiano wypełniony skrzepem krwi. Dodatkowo w grupach badanych biomateriał wprowadzano w mięsień prosty grzbietu oraz w tkankę podskórną na grzbiecie. Rany po zabiegach szczelnie zaszywano. U wszystkich zwierząt wykonano badania kliniczne gojenia się ran po zabiegu, badania radiologiczne kości w miejscach wprowadzenia kompozytów i wykonania ubytku kostnego oraz badania histopatologiczne preparatów kostnych i narządów wewnętrznych - wątroby i nerek. Okresy kontrolne wyznaczono na 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 tygodni.

## Wyniki

Badania kliniczne wykazały prawidłowe gojenie się ran pooperacyjnych u wszystkich zwierząt doświadczalnych. W żadnej z grup nie obserwowano odczynów zapalnych ani patologicznej wydzieliny z rany. Rany goiły się pierwotnie przez rychłozrost, a czas ich całkowitego wygojenia wynosił 10-14 dni. Badania radiologiczne we wszystkich grupach wykazały od 7 doby widoczne okrągłe przejaśnienie o regularnych brzegach wielkością odpowiadające wykonanemu ubytkowi kostnemu. Począwszy od 6 tygodnia w grupach badanych przejaśnienie ulegało stopniowemu zaciemnieniu, co świadczyło o postępującej mineralizacji. W grupie kontrolnej widoczne było zaciemnienie z pojawiającymi się w jego świetle wyspowatymi przejaśnieniami. Po okresie 24 tygodni w grupach badanych jak i grupie kontrolnej przejaśnienie było ledwo dostrzegalne i nieznacznie różniło się od otoczenia co świadczy o tym, że ubytek wypełniony był już zmineralizowaną tkanką kostną. W badaniu histopatologicznym w grupie P(LLA/GA)+CF po 21 dniach obserwacji widoczna była dobrze uformowana ściana kanału pokryta na całej powierzchni przez dojrzałą tkankę łączną włóknistą z licznymi włóknami kolagenowymi. Bezpośrednio z nią sąsiadowały linijnie ułożone dojrzałe beleczki kostne bez cech aktywności osteoblastycznej. Głębiej w tkance łącznej włóknistej obecne były jeszcze dojrzewające beleczki kostne pokryte osteoblastami. W tym samym 3-tygodniowym okresie w grupie P(LLA/GA)+TCP kanał wszczępu był wyraźnie uformowany i miejscami pokryty odbudowującą się tkanką kostną. W grupie kontrolnej już 14-dniowa obserwacja wykazała w świetle kanału wśród przerosniętego tkanką łączną skrzepu krwi cechy odnowy tkanki kostnej. Po 3-tygodniowej obserwacji kanał żębobodu prawie w całości wypełniony był tkanką kostną o różnym stopniu dojrzałości. Widoczny był również proces aktywnej angiogenezy. W 24 i 48 tygodniu w grupie P(LLA/GA)+CF kanał wszczępu został całkowicie wypełniony przez rozrastającą się tkankę kostną, w której znajdowały się włókna węglowe. Tkanka kostna wypełniająca kanał wszczępu nie wykazywała już cech aktywności osteoblastycznej.

Bone was drilled with 3,2 mm diameter bur in the the interior margin. Than prepared bone was filled with P(LLA/GA)+CF implant in the group I, P(LLA/GA)+TCP in the II group, and was left filled with blood clot in the control group III. Additionally in the I and II group implant was placed under the skin and in the muscles of the back. For all animals clinical examination and then (after the rabbits were killed) radiological, histopathological and macroscopy evaluation were performed in 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 week.

## Results

All postoperative examinations revealed good healing of wounds, without complications. There were no inflammatory reactions or pathological wound excretion. Primary healing was observed within 10-14 days. 7 days radiological examination in all three groups revealed round brightening with regular edges, which was corresponding with diameter and size with the bone defect. In next periods in the I and II group the brightening area was less regular and starting from 6 week were gradual shading, what indicated on progressive mineralization. In the control group there was visible round shading with island like dots of mineralization. Since 24 weeks in all groups form of slightly shadow mineralized bone have been seen which did not differ from the surrounding bone. Histopathological examination revealed, that in the group P(LLA/GA)+CF after 21 days of observation, there were visible well formed canals wall, which were covered by fibrous tissue (with many collagen fibers) on all area. Directly with this fibrous tissue there were neighboring trabecular without osteoblastic activity. Deeper in the fibrous tissue there were still maturing timber bone, with were covered by osteoblasts. In the same 3-weeks period in P(LLA/GA)+TCP group canal of implanted sample was clearly formed and covered with recovering bone. In the control group III after 14 days there were traces of bone regeneration within blood clot. After 3 weeks bone defect was filled with bone in different stadium of mineralization. There were active angiogenetic processes. Mature trabecular bone could be observed not until 12 week of observation. On 24 and 48 week in P(LLA/GA)+CF group canal of implant was completely filled by growing bone between carbon fibers. Osseous tissue which filled the canal of the implanted materials did not demonstrated osteoblastic activity. However the border between new and surrounding bone was still visible. In the young, not calcificated osseous tissue were lots of capillars. In the P(LLA/GA)+TCP group after 24 weeks of observation peripheral polymer resorption and dilution of his structure could be observed. After 48 weeks of experiment implant canal was covered by mature bone. Inside the canal there were little TCP fragments surrounded by the macrophages (mononucleus and multinucleus). We did not observed giant cell granulomas (type around the foreign body). There were no trace of copolymer. In the control group after 24 and 48 weeks bone defect was regenerated with mature spongy bone with fat and blood vessels. In both groups after one week of observation polymer that was placed under the skin was surrounded by thin connective tissue capsule that within the time became thicker and was built of collagen fibers and fibroblasts. 48 week observation revealed that the implant was completely replaced by fibrous tissue. There were presence of macrophages which created foreign body granulomas surrounding TCP and carbon fibers particles. There were no symptoms of inflammatory response. In the dorsal muscles around the implant connective tissue capsule was present. At the beginning it was thin but within the 3 weeks become thicker. After 24 weeks implants were covered by thick fibrous tissue capsule built of collagen fibers. Implants were fragmented, and particles

Jednak granica między wytworzonym kanałem, a wypełniającą go nową tkanką kostną rozrastającą się na „rusztowaniu” z włókien węglowych była jeszcze widoczna. W młodej nieuwapnionej tkance kostnej wypełniającej kanał wszczepu i przypominającej kość zbitą znajdowały się liczne włosowate naczynia krwionośne. W grupie P(LLA/GA)+TCP po 24 tygodniach obserwacji zauważalna była obwodowa resorpcja polimeru oraz centralne rozrzedzenie jego struktury. Po 48 tygodniach doświadczenia kanał wszczepu pokryty był przez dojrzałą tkankę kostną. W świetle kanału widoczne były liczne drobiny TCP, wokół których znajdowały się pojedyncze makrofagi jedno- i wielojądrowe. Nie obserwowano ziarniniaków olbrzymiokomórkowych typu „około ciała obcego”. Nie obserwowano już złogów kopolimeru. W grupie kontrolnej po 24 i 48 tygodniach doświadczenia, w miejscu wcześniejszego ubytku widoczna była całkowita odbudowa tkanki kostnej. Obserwowano dojrzałą kość zbitą oraz liczne beleczki kostne tworzące strukturę kości gąbczastej. Pomiędzy nimi widoczna była śródkostna tkanka tłuszczowa i włosowate naczynia krwionośne. W obu grupach po tygodniowej obserwacji wszczep wprowadzony podskórnie otoczony był cienką torebką łącznotkankową, która w kolejnych tygodniach stawała się grubsza i zbudowana była z włókien kolagenowych i fibroblastów. Po 48 tygodniach w obu grupach wprowadzony podskórnie materiał został przerośnięty przez tkankę łączną włóknistą. Wśród rozrastającej się tkanki widoczne były liczne makrofagi jedno- i wielojądrowe tworzące wokół fragmentów TCP i włókien węglowych ziarniniaki olbrzymiokomórkowe typu około ciała obcego. Po tak długim okresie nie obserwowano już złogów kopolimeru. W otaczającej wszczep tkance nie występował odczyn zapalny.

W mięśniach prostych grzbietu od pierwszego tygodnia obserwacji wokół wszczepu kształtowała się torebka łącznotkankowa, która po 3 tygodniach była już gruba zbudowana z włókien kolagenowych i fibroblastów. Po 24 tygodniach doświadczenia wszczep był rozfragmentowany, a jego struktura rozrzedzona. Wśród kopolimeru widoczne były liczne drobiny TCP lub włókien węglowych. Po 48 tygodniach obserwacji w obu grupach wszczepiony materiał był wyraźnie odgraniczony od tkanki mięśniowej i w całości przerośnięty przez tkankę łączną włóknistą tworząc ziarninę olbrzymiokomórkową. W obu grupach widoczne były jeszcze liczne komórki olbrzymie wielojądrowe wokół drobin TCP i włókien węglowych. W grupie P(LLA/GA)+CF miejscowo podtorebkowo spostrzegano ogniska drobnokomórkowego wysięku zapalnego o niewielkim nasileniu złożonego z komórek plazmatycznych i limfocytów. W badaniu histopatologicznym narządów wewnętrznych nie stwierdzono obecności zmian patologicznych.

## Dyskusja

Zaletą kopolimerów kwasu mlekowego i glikolowego jest biodegradacja i termoplastyczność pozwalająca na dowolne ich formowanie w zależności od warunków anatomicznych. Toksyczne związki, które powstają w procesie tworzenia polimerów z zastosowaniem oktianu cyny zostały wyeliminowane poprzez zamianę inicjatora na cyrkonowy [4]. Tak otrzymane polimery są bardziej przyjazne dla organizmów żywych i z powodzeniem mogą być stosowane w medycynie [5,6]. Połączenie kopolimerów z włóknem węglowym czy TCP nadaje im dodatkowo korzystne cechy, co zostało wcześniej sprawdzone na przykładzie polisulfonu [7]. Badania kliniczne przeprowadzone po wykonanych zabiegach operacyjnych wykazały jednakowe gojenie się ran we wszystkich trzech grupach, co może świadczyć o dobrej tolerancji wszczepów we wczesnym okresie poope-

of carbon fibers and TCP were present. After 48 weeks connective tissue almost completely ingrown the implants creating gigantic cell granulomas surrounding particles of carbon fibers and TCP. There was no visible changes in the microscopic examination of kidneys and liver.

## Discussion

The big advantage of lactide-co-glycolide polymers is biodegradation and thermoplastic properties. Changes in manufacturing process allowed to obtain copolymers that can be safely use in medicine [4,5,6]. Application of additives to the polymer structure like CF or TCP allow to obtain material with different properties, what was previously proved with polysulphone studies [7]. Clinical examination in postoperative period revealed good healing without disturbances in all three groups. Early postoperative soft tissue and bone inflammatory response can cause implant lost. Radiological examination in all groups were similar. This result was a little surprising, because TCP unlike short carbon fibers and P(LLA/GA) polymers absorb x-rays, so it was supposed to be visible on radiograms. Similar radiograms of both material in the early postoperative period may results from small amount of TCP and CF in the copolymer. Differences between both groups in histopatological examination may results from biological properties of TCP and CF. Short carbon fibers reinforce copolymer, improving its mechanical resistance. Reinforced copolymers may be used as a fixating elements in facial bone fractures. Tricalcium phosphate have a high biological activity stimulating bone regeneration. This can be seen in 3 week of observation where active bone regeneration was observed. Similar results were achieved by other authors [8,9]. Carbon fibers can be used alone in bone regeneration, creating scaffold for new bone formation. In the control group bone formation within bone defect was seen after 21 days. This demonstrate physiological bone healing process. Histopathological evaluation of kidney and liver did not revealed any pathological changes.

racyjnym i braku infekcji. Wczesna infekcja pooperacyjna w miejscu implantacji może powodować nasilone odczyny zapalne ze strony tkanek miękkich i kości co prowadzi do natychmiastowej utraty wszczepu. Badania radiologiczne we wszystkich grupach wykazały duże podobieństwo. Takie wyniki nieco zaskakują ponieważ TCP w odróżnieniu od kopolimerów P(LLA/GA) i krótkich włókien węglowych jest widoczny na kliszach rentgenowskich, a krótkie włókna węglowe i kopolimery P(LLA/GA) są przepuszczalne dla promieni RTG. Podobieństwo w obrazach RTG między obydwoma materiałami może wynikać z niedużego stosunku objętościowego TCP (15%) w badanych kompozytach. Trzeba również wziąć pod uwagę możliwość nałożenia się sąsiadujących struktur kostnych na obraz wszczepu podczas wykonywania zdjęć. Różnica w obrazie histopatologicznym pomiędzy badanymi grupami może wynikać z właściwości biologicznych badanych materiałów dodanych do kopolimeru P(LLA/GA). Fosforan trójwapniowy posiada dużą aktywności biologiczną, w związku z czym stymuluje odbudowę tkanki kostnej, co można zaobserwować już w 3 tygodniu doświadczenia, gdzie wokół wszczepu P(LLA/GA)+TCP stwierdzono obecność tkanki kostnej. Podobne wyniki otrzymali inni autorzy badając kompozyty na bazie kopolimeru P(LLA/GA) z hydroksyapatytem [8,9]. Krótkie włókna węglowe z kolei poprawiają mechaniczne właściwości wszczepów. Mogą one być również z powodzeniem stosowane do odbudowy nowej tkanki kostnej, ponieważ stanowią szkielet do narastania nowej kości co jest pomocne w sterowanej regeneracji tkanki kostnej. Włókna węglowe nie są jednak materiałem biologicznie czynnym. W grupie kontrolnej można zaobserwować obecność tkanki kostnej począwszy od 3 tygodnia doświadczenia. Obrazuje to przebieg fizjologicznego gojenia się ubytków kostnych. W narządach wewnętrznych nie stwierdzono obecności zmian patologicznych. Wątroba i nerki będące narządami detoksykacyjnymi organizmu zarówno w grupach badanych jak i grupie kontrolnej nie wykazały zmian.

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Seal B.L., Otero T.C., Panitch A., Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mat.Sci.Eng.R.*(2001), 34:147-230.
- [2] Chłopek J., Pamuła E., Błazewicz M., Makinen K. Composite materials from a new biodegradable glycolide-lactide copolymer for medical applications. *Inż. Biomat.* 2000, 12, 23-28.
- [3] Pitt C.G., Gratzel M.M., Kimmel G.L., Surles J., Schindler A.: Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly( $\epsilon$ -caprolactone) and the copolymers in vivo, *Biomaterials* (1981), 2:215-20.
- [4] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., Nowe możliwości syntezy i zastosowania w medycynie biodegradowalnych kopolimerów glikolidu nie zawierających cyny. *Inż. Biomat.* 2002, 23-25, 27-29.
- [5] Chłopek J., Kmita G., Non-metallic composite materials for bone surgery, *Engineering Transaction* (2003) 51, 2-3: 307-323.
- [6] An Y.H., Woolf S.K., Friedman R.J.: Pre-clinical in vivo evaluation of orthopedic bioabsorbable devices, *Biomaterials* (2000) 21, 2635-52.
- [7] Adwent M., Cieślik-Bielecka A., Proszek M., Bajor G., Sabat D., Cieślik T. *Polimery w I Katedrze i Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej w Zabrze. Ann. Acad. Med. Sil.* 2004, 83, 10-13.
- [8] Adwent M., Cieślik-Bielecka A., Proszek M., Bajor G., Sabat D., Cieślik T. Wczesne obserwacje gojenia się wszczepów kopolimerów P(LLA/GLA)+HA wszczepionych w żuchwę i tkanki miękkie królików.
- [9] Chłopek J., Morawska-Chochół A., Rosół P.: Mechanizm regeneracji tkanki kostnej po implantacji kompozytu z polimeru resorbowalnego modyfikowanego hydroksyapatytem. *Inż. Biomat.* 2006, 58-60, 98-101.

# OCENA WPŁYWU WARUNKÓW IN VITRO NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE POLIMERÓW RESORBOWALNYCH O RÓŻNYM CZASIE RESORPCJI

J. CHŁOPEK<sup>1</sup>, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>1</sup>, B. SZARANIEC<sup>1</sup>,  
M. ZIĄBKA<sup>1</sup>, M. EL FRAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII  
MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>2</sup>POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW,  
ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH,  
UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN, POLSKA

## Streszczenie

*Celem pracy była ocena szybkości degradacji różnych polimerów resorbowlanych przetwarzanych metodą wtrysku oraz wpływu sztucznego środowiska biologicznego na zmianę właściwości mechanicznych (wytrzymałość, moduł Younga, odkształcalność) badanych materiałów.*

*Na podstawie przeprowadzonej analizy, badane polimery można podzielić na dwie grupy: o krótkim czasie degradacji i towarzyszącej temu szybkiej zmianie parametrów mechanicznych (PGLA, PLDLA i blendy PLDLA+PGLA) oraz ulegające wolniejszej degradacji i stopniowej zmianie parametrów mechanicznych (GS i blendy GS+PLDLA). Rodzaj użytego płynu inkubacyjnego znacząco wpływa na zmianę parametrów mechanicznych próbek.*

*Obserwowane zmiany właściwości mechanicznych badanych polimerów związane są z rozrywaniem łańcuchów polimerowych i rozluźnieniem struktury materiałów w wyniku degradacji hydrolitycznej.*

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 25-28]

## Wstęp

Przed biomateriałami dla zastosowań medycznych, oprócz warunku biouzgodności, stawia się również wymóg biofunkcyjności. Pod pojęciem biofunkcyjności, rozumie się konieczność spełnienia przez implant wszystkich funkcji, jakie wynikają z jego przeznaczenia. W wielu zastosowaniach medycznych dotyczy to właściwości mechanicznych implantów [1]. W pierwszym etapie implantacji biomateriał odpowiada za stabilizację fragmentów leczonej tkanki i przenoszenie obciążeń. Ważna jest wtedy wysoka wytrzymałość początkowa i moduł Younga dopasowany do sztywności leczonej tkanki. Następnie, utrata wytrzymałości implantów resorbowlanych związana z ich degradacją powinna być dopasowana do szybkości regeneracji tkanki. Polimery resorbowlane najczęściej znajdują zastosowanie jako scaffoldy w inżynierii tkankowej [2] oraz jako osnowy i/lub włókna w kompozytach resorbowlanych, częściowo resorbowlanych lub gradientowych, z kontrolowanym gradientem resorpcji i właściwości mechanicznych [3].

Najprostszą metodą otrzymywania implantów/elementów polimerowych (śruby, płytki itp.) jest metoda wtrysku. Metoda ta umożliwia otrzymywanie w prosty sposób dużej ilości produktów jednorodnych o bardzo zbliżonych parametrach.

# INFLUENCE OF IN VITRO CONDITIONS ON MECHANICAL PROPERTIES OF RESORBABLE POLYMERS WITH DIFFERENT RESORPTION TIME

J. CHŁOPEK<sup>1</sup>, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>1</sup>, B. SZARANIEC<sup>1</sup>,  
M. ZIĄBKA<sup>1</sup>, M. EL FRAY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30, MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>2</sup>SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE,  
DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES,  
10, PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND

## Abstract

*The aim of the presented work was the analysis of the degradation rate of different resorbable polymers processed by injection moulding and estimation of the influence of in vitro conditions on the changes of their mechanical properties (strength, Young's modulus, elongation).*

*The analysis of the results showed that two groups of tested polymers can be distinguished: the first one, revealing faster changes of mechanical properties due to short degradation time (PGLA, PLDLA and PLDLA+PGLA blend) and the second one, with longer degradation rate and gradual changes of mechanical properties (GS and GS+PLDLA blend).*

*Changes of mechanical properties are connected with the scission of the polymer chains and loosening of the structure as a result of hydrolytic degradation.*

*The type of incubation solution affects the rate of decrease of mechanical properties.*

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 25-28]

## Introduction

Biocompatibility and biofunctionality are the most important requirements for biomaterials in medical applications. Biofunctionality is defined as a necessity of fulfilling by the implants all of the functions connected with their application. For many medical uses, mechanical properties of implants are very important parameters [1]. In the first stage of implantation of resorbable biomaterials, stabilization of the treated tissue fragments and stress transfer are important functions of the implant. High initial strength and Young's modulus matching the properties of treated tissue are very important at this stage. In the following step, decrease of the implants strength connected with their degradation should be compatible with the rate of tissue regeneration. Resorbable polymers are usually applied as scaffolds in tissue engineering [2] and also as matrices and/or fibres in resorbable, partially resorbable or graded composites, with a controlled resorption gradient or mechanical properties [3].

Injection moulding is a simple and useful method for obtaining polymeric implants or their elements (screws, plates etc.). Simple and efficient production of homogeneous implants is possible with the use of this method. However, high temperature of injection moulding process can cause changes in polymer structure, especially in the case of resorbable polymers and also accelerates their degradation.



Jednakże wtrysk będący procesem wysokotemperaturowym może powodować zmiany w strukturze polimeru (zwłaszcza resorbowalnego) i przyspieszać jego późniejszą degradację. Dlatego też, konieczne wydają się badania nie tylko polimerów wyjściowych, ale również po przetwórstwie.

W pracy oceniono szybkość degradacji szeregu materiałów resorbowalnych przetworzonych metodą wtrysku oraz zbadano zmianę ich właściwości mechanicznych (wytrzymałość, moduł Younga, odkształcalność) pod wpływem działania symulowanego środowiska biologicznego (badania in vitro). Taka charakterystyka ma w przyszłości ułatwić dobór materiału polimerowego dla konkretnych zastosowań medycznych.

## Materiały

W pracy poddano badaniom 5 następujących materiałów resorbowalnych:

- GS – skrobia komercyjna,
- PGLA – poli(L-laktyd-co-glikolid), 85% LA/15% GA,
- PLDLA – poli(DL-laktyd), 30% DL/70% LL,
- GS+PLDLA – blendy polimeru GS i PLDLA,
- PLDLA+PGLA – blendy polimeru PLDLA i PGLA.

Kopolimery PGLA i PLDLA otrzymano w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze [4].

Próbki w kształcie wiosełek otrzymano metodą wtrysku w temp. 185°C. Następnie wiosełka poddano inkubacji w wodzie destylowanej i w płynie Ringera w temperaturze 37°C przez okres 6 tygodni. Po każdym tygodniu inkubacji rejestrowano zmiany przewodnictwa płynów przy użyciu konduktometru Elmetron typ CC-315. W czasie eksperymentu dwukrotnie wymieniono płyny (po upływie 2 i 4 tygodni). Po 2, 4 i 6 tygodniach inkubacji przeprowadzono badania mechaniczne próbek na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej (Zwick 1435), określając w próbach rozciągania wytrzymałość, moduł Younga oraz wydłużenie materiałów.

## Wyniki i dyskusja

Szybkość degradacji badanych materiałów polimerowych określono na podstawie pomiarów przewodnictwa wody destylowanej, w której inkubowano próbki (RYS. 1). Procesy degradacji przebiegają najszybciej w przypadku materiału PGLA, natomiast nieco wolniej dla kopolimeru PLDLA. W porównaniu do tych dwóch materiałów skrobia degraduje najwolniej. Warto zauważyć, że w przypadku blendy PLDLA+PGLA szybkość degradacji jest zdecydowanie wolniejsza niż dla poszczególnych polimerów składowych. Podobnie sytuacja wygląda w przypadku blendy GS+PLDLA. Może to być związane z podniesieniem stopnia krystaliczności w warstwie przejściowej między polimerami, co obniża szybkość degradacji [5].

Wyjściowa wytrzymałość mechaniczna próbek PGLA i PLDLA jest zbliżona, jednak już po 2 tygodniach inkubacji w wodzie destylowanej wartość tego parametru dla PGLA gwałtownie spada, co koreluje z szybszą degradacją tego materiału (RYS. 2a). Między 2 a 4 tygodniem inkubacji, wytrzymałość PLDLA drastycznie spada i uzyskuje zbliżoną wartość do wytrzymałości PGLA. Wytrzymałość PLDLA w porównaniu do PLDLA+PGLA utrzymuje się na wyższym poziomie w całym okresie inkubacji, pomimo zdecydowanie szybszej degradacji PLDLA. Zmiana wytrzymałości próbek GS i GS+PLDLA następuje stopniowo, jednak wytrzymałość blendy jest zdecydowanie wyższa w całym okresie inkubacji.

Obserwuje się znaczący wpływ składu płynu, w którym są inkubowane próbki, na ich właściwości mechaniczne (RYS. 2b).

Therefore, it is necessary to perform detailed studies on the properties of these polymers at the initial stage and after processing.

In this work, the degradation rate of the series of resorbable materials processed by injection moulding was evaluated. Mechanical properties changes (strength, Young's modulus, elongation) under the influence of simulated biological environment (in vitro studies) were also performed. Such characteristic will facilitate proper selection of polymeric materials for the specific medical applications.

## Materials

In the present work, 5 following materials were investigated:

- GS – commercial starch,
- PGLA – poly(L-lactide-co-glycolide), 85% LA/15% GA,
- PLDLA – poly(DL-lactide), 30% DL/70% LL,
- GS+PLDLA – blend of GS and PLDLA,
- PLDLA+PGLA – blend of PLDLA and PGLA.

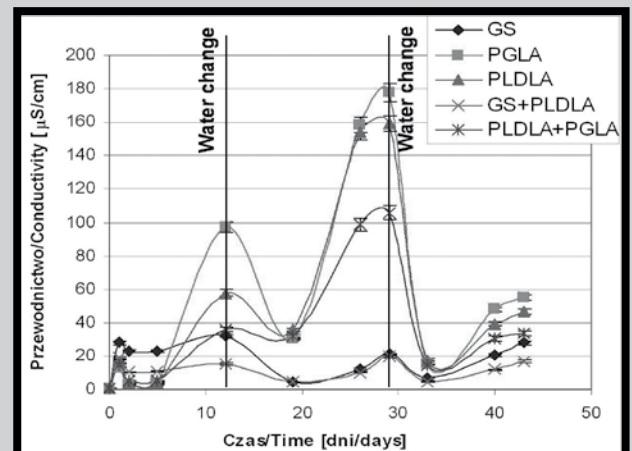
The synthesis of PGLA and PLDLA copolymers was performed at the Centre of Polymer and Carbon Materials in Zabrze (Poland) [4]. The samples were prepared by injection moulding in 185°C.

Next, the specimens were incubated in distilled water and in Ringer solution in 37°C during 6 weeks. After every week, conductivity changes were measured by using Elmetron conductometer, type CC-315. The immersing solution was exchanged two times during experiments (after 2 and 4 weeks). Mechanical properties of polymers were measured after 2, 4 and 6 weeks of incubation by using universal testing machine (Zwick 1435). In axial tension, the strength, Young's modulus and elongation of samples were tested.

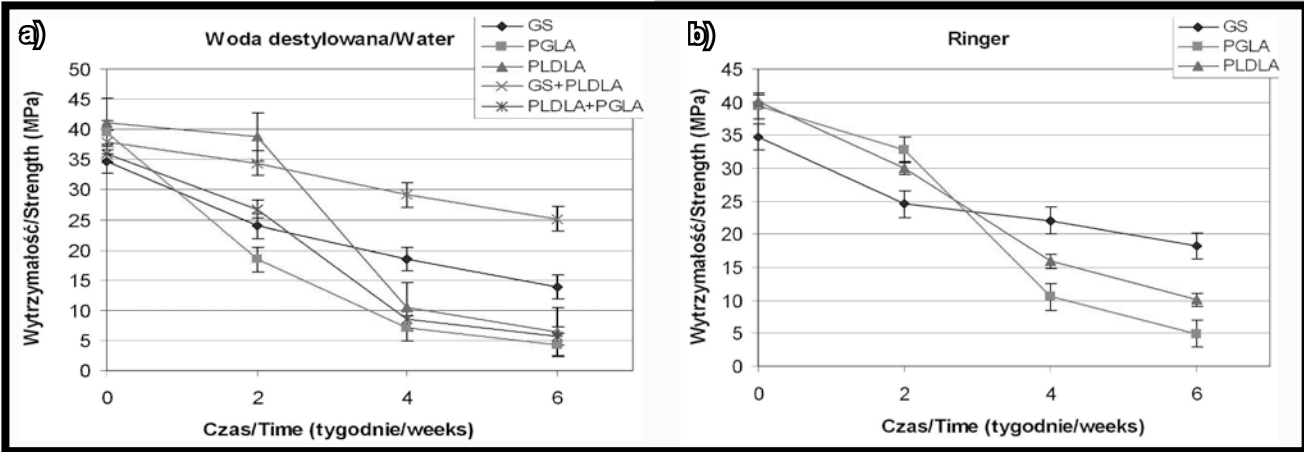
## Results and discussion

Degradation rate of studied polymeric materials was estimated on the basis of water conductivity measurements after samples incubation (FIG. 1). Degradation processes are the most intensive in the case of PGLA, and a little slower for PLDLA copolymer.

In comparison to these materials, the starch (GS) degradation is the most slower. Remarkable is, that the degradation rate of the PLDLA+PGLA blend is significantly lower than for single copolymers. Similar situation can be observed for GS+PLDLA blend. Decrease of the degradation rate may be caused by higher degree of crystallinity of



RYS. 1. Zmiany przewodnictwa wody destylowanej w funkcji czasu inkubacji próbek.  
FIG. 1. Conductivity of distilled water after different incubation time.



**RYS. 2.** Zmiany wytrzymałości na rozciąganie badanych próbek w funkcji czasu inkubacji: a) w wodzie destylowanej, b) w płynie Ringera.

**FIG. 2.** Changes of samples' strength as the function of incubation time: a) in distilled water, b) in Ringer solution.

Dla próbki GS różnice nie są znaczące, natomiast w przypadku PGLA drastyczny spadek wytrzymałości następuje dopiero po 4 tygodniach inkubacji. Również dla PLDLA zmiany wytrzymałości są mniejsze niż w czasie inkubacji w wodzie destylowanej. Wskazuje to na wolniejszą degradację hydrolytyczną tych materiałów w płynie Ringera.

Zmianom wytrzymałości towarzyszą analogiczne zmiany modułu Younga (RYS. 3 a,b). W przypadku inkubacji w wodzie destylowanej najszybciej obniża się moduł Younga próbki PGLA, najwolniej zaś w przypadku blendy GS+PLDLA. Różnicę stanowi zachowanie się blendy PLDLA+PGLA, w przypadku której niewielkie zmiany modułu Younga nie korelują z szybką utratą wytrzymałości. Płyn Ringera spowalnia obniżanie modułu Younga badanych próbek, co najwyraźniej jest widoczne w przypadku próbki PGLA.

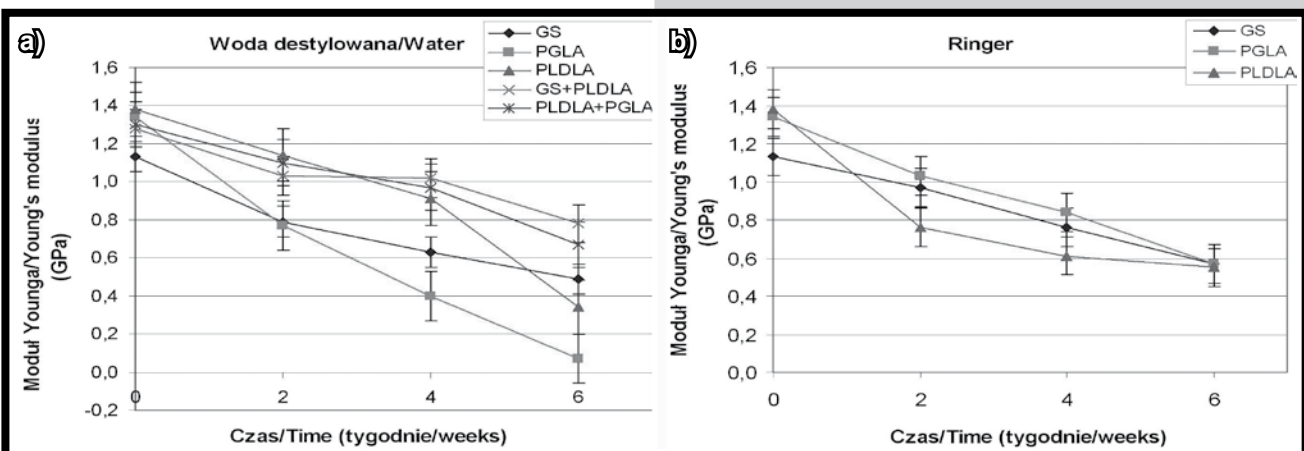
Analizując zmianę odkształcalności badanych próbek obserwuje się jej zmniejszanie w wyniku inkubacji (RYS. 4a,b). W przypadku próbek kontaktujących się z wodą destylowaną, zmiana ta jest największa dla PLDLA po 4 tygodniach inkubacji (RYS. 4a). Inkubacja w płynie Ringera wpływa znacząco na zmniejszenie odkształcalności GS już po 2 tygodniu, natomiast dla PGLA i PLDLA po 4 tygodniu (RYS. 4b).

Obserwowane zmiany badanych parametrów mechanicznych próbek w warunkach in vitro związane są z rozrywaniem łańcuchów polimerowych w wyniku degradacji hydrolytycznej. Powstające oligomery ulegają rozpuszczeniu i są usuwane z matrycy polimerowej, na co wskazuje

the interface layer between components [5]. The value of the initial strength of PGLA and PLDLA copolymers is found at similar level, however after 2 weeks from incubation in water, the value of this parameter is significantly lower for PGLA, and it is correlated with the faster degradation of this material (FIG. 2a). Between 2 and 4th week of incubation, drastic strength decrease of PLDLA is observed and it approaches the PGLA value. The strength of PLDLA is higher in all observation periods in comparison with PLDLA+PGLA, despite significantly faster degradation of PLDLA. Gradual changes of the GS strength and GS+PLDLA samples are visible however, the blend strength is significantly higher in all observation periods.

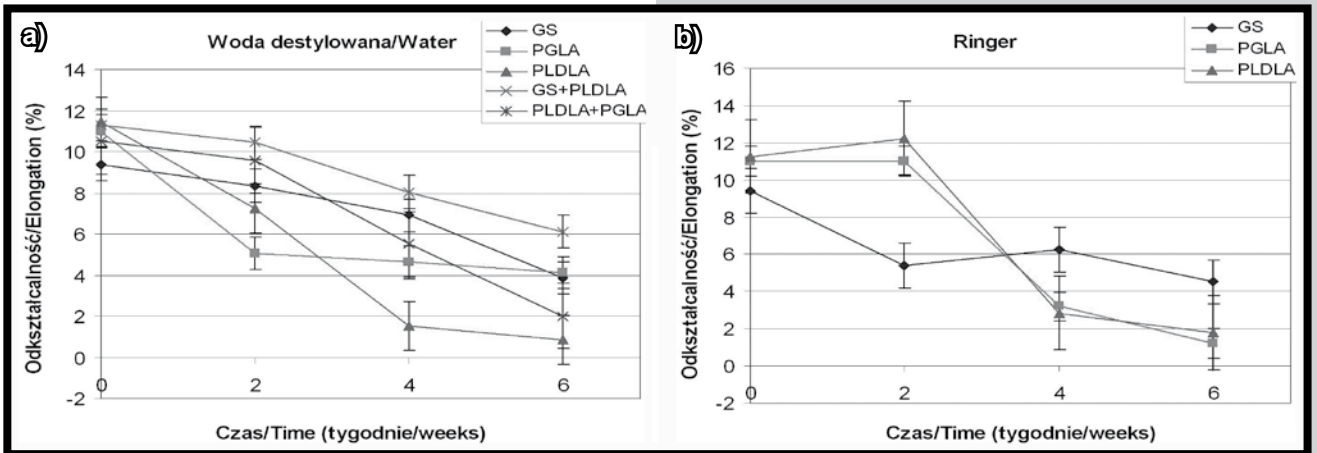
The influence of the type of incubation fluid on the samples mechanical properties can also be observed (FIG.2b). For GS and PLDLA changes are not so intensive however, in the case of PGLA copolymer, drastic decrease of the strength is visible after 4 weeks of incubation. It indicates that hydrolytic degradation of samples is slower in Ringer solution as compared to distilled water.

Similar behaviour to strength changes is observed for Young's modulus (FIG. 3a,b). For samples incubated in distilled water, decrease of the Young's modulus of PGLA copolymer is the most intensive. On the other hand, changes of this parameter are slowest for GS+PLDLA blend. Different behaviour can be observed for PLDLA+PGLA blend, where the slight changes of Young's modulus are not correlated



**RYS. 3.** Zmiany modułu Younga badanych próbek w funkcji czasu inkubacji: a) w wodzie destylowanej, b) w płynie Ringera.

**FIG. 3.** Changes of Young's modulus of samples as the function of incubation time: a) in distilled water, b) in Ringer solution.



**RYS. 4. Zmiany odkształcalności wydłużenia badanych próbek w funkcji czasu inkubacji: a) w wodzie destylowanej, b) w płynie Ringera.**

**FIG. 4. Changes of samples' elongation as the function of incubation time: a) in distilled water, b) in Ringer solution.**

wzrost przewodnictwa płynów. Rozluźnienie struktury oraz skracanie łańcuchów polimerowych wpływają bezpośrednio na obniżenie wytrzymałości i modułu Younga, a także na zmniejszenie odkształcalności materiałów.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej analizy, badane polimery można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich należą PGLA, PLDLA i blendy PLDLA+PGLA, charakteryzują się one krótkim czasem degradacji i towarzyszącą temu szybką zmianą parametrów mechanicznych w wyniku kontaktu z płynami fizjologicznymi. Drugą grupę stanowią materiały GS i blendy GS+PLDLA, ulegające wolniejszej degradacji i stopniowej zmianie parametrów mechanicznych.

Parametry mechaniczne badanych materiałów różnią się znacznie między sobą w zależności od środowiska, w którym inkubowano próbki. Wskazuje to na znaczący wpływ składu płynu fizjologicznego na przebieg degradacji polimerów, a tym samym na ich biofunkcyjność.

Metoda wtrysku pozwala na otrzymanie elementów implantacyjnych o pożądanym kształcie w sposób powtarzalny i wydajny, ograniczając przy tym koszty przetwórstwa.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego Nr 0408/R/2/T02/06/01, ze środków Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

## Piśmiennictwo

- [1] Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000 pod red. Nałęcza M., Tom 5 - Biomechanika i Inżynieria Rehabilitacyjna, redaktorzy tomu: Będziński R., Kędzior K., Kiwerski J., Morecki A., Skalski K., Wall A., Wit A., Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2004.
- [2] Kellomäki M., Niiranen H., Puumanen K., Ashammakhi N., Waris T., Törmälä P., Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation, *Biomaterials* 21, 2000, 2495-2505.
- [3] Mano J.F., Sousa R.A., Boesel L.F., Neves N.M., Reis R.L., Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments, *Composites Science and Technology* 64, 2004, 789-817.
- [4] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Synthesis of Biodegradable Copolymers with the Use of Low Toxic Zirconium Compounds. 1. Copolymerization of Glycolide with L-Lactide Initiated by Zr(Acac)<sub>4</sub>, *Macromolecules* 34, 2001, 5090-5099.
- [5] Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Wnek G.E., Bowlin G.L., Eds., New York, London 2008.

## References

with fast strength decrease. Changes of Young's modulus are not so intensive for samples incubated in Ringer solution, and it is the most significant for the PGLA copolymer.

Decrease of the samples elongation is visible during incubation (FIG. 4a,b). In the case of samples incubated in distilled water, the most significant changes can be observed for PLDLA after 4 weeks of measurements (FIG. 4a). As a result of samples incubation in Ringer solution, decrease of elongation in the case of GS polymer can be observed already after 2 weeks, and after 4 weeks in the case of PGLA and PLDLA copolymers (FIG. 4b).

Changes of the mechanical properties of samples under the influence of *in vitro* conditions are connected with breaking of the polymer chains as the consequence of hydrolytic degradation. Soluble oligomers are removed from the matrix, what is indicated by increase of the conductivity. Decrease of the samples strength, their Young's modulus as well as elongation is influenced by destruction of polymer structure and scission of their chains.

## Conclusions

*In vitro* degradation studies of resorbable polymers allowed to distinguish the two groups of investigated materials. PGLA, PLDLA copolymers and PLDLA+PGLA blend undergo fast hydrolytic degradation and their mechanical properties are changed in contact with solution during short time. Others materials (GS and GS+PLDLA blend) are characterized by slower degradation and gradual changes of mechanical properties. The differences in mechanical properties of the same type of samples are observed depending on immersing solution. It indicates that course of degradation, as well as biofunctionality are influenced by chemical composition of physiological solution.

Injection moulding is cost effective processing method which allows to achieve high reproducibility of implant elements with targeted shape and geometry.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the research project No 0408/R/2/T02/06/01, financed by the Ministry of Science and Higher Education.

# BADANIA REAKTYWNOŚCI LEUKOCYTÓW KRWI PO KONTAKCIE Z MATRYCAMI ŻELATYNOWO-ALGINIANOWYMI

MARIA SZYMONOWICZ<sup>1</sup>, ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL<sup>2</sup>, STANISŁAW PIELKA<sup>1</sup>, JAROSŁAW KRÓL<sup>2</sup>, STANISŁAW GRACZYK<sup>2</sup>, DOROTA HAZNAR<sup>3</sup>, JANUSZ PLUTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA MEDYCZNA, ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA MATERIAŁÓW, UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCLAW, POLSKA

<sup>2</sup>UNIwersytet Przyrodniczy, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii, ul. Norwida 31, 50-375 WROCLAW POLSKA

<sup>3</sup>AKADEMIA MEDYCZNA, KATEDRA I ZAKŁAD TECHNOLOGII POSTACI LEKU, UL. SZEWSKA 38, 50-139 WROCLAW, POLSKA

\* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 29-30]

## Wprowadzenie

Przy ocenie biomateriałów przeznaczonych do czasowego kontaktu z tkankami niezbędna jest obserwacja wzajemnych relacji materiału i komórek krwi, dotyczących ewentualnych zmian morfologicznych i czynnościowych [1,2].

Zmiany morfologiczne w komórkach, wynikające ze zmian ich reaktywności, związane są m.in. z reorganizacją cytoszkieletu komórkowego [3]. O reorganizacji cytoszkieletu pośrednio może świadczyć pojawienie się w komórkach jednojądrzastych krwi radialnej segmentacji jądra (RS) – są to głębokie szczeliny w jądrze, zbiegające się koncentrycznie w centrum i powstające w wyniku przyspieszonej depolimeryzacji mikrotubuli [4-6].

Zdolność komórek do fagocytozy umożliwia usuwanie z organizmu czynników chorobotwórczych pochodzenia zewnętrznego, jak również usuwanie endogennych substancji toksycznych, komórek rozpadłych [6]. W trakcie przebiegu tego procesu nasileniu ulega metabolizm tlenowy komórek żernych (np. granulocytów). W wyniku tlenowych przemian metabolicznych komórki produkują aktywne związków tlenu. Związki te ze względu na ich toksyczność, z jednej strony są wykorzystywane przez komórki w trakcie wypełniania funkcji (np. tlenozależny układ niszczenia drobnoustrojów neutrofilii). Z drugiej jednak, przyczyniają się do przyspieszonego starzenia się czy uszkodzenia komórek (stres oksydacyjny).

Celem pracy była ocena zmian morfologicznych oraz czynnościowych leukocytów po czasowym kontakcie krwi z matrycami żelatynowo-alginianowymi w badaniach in vitro.

## Materiały

Do badań użyto czterech rodzajów matryc żelatynowo-alginianowych o strukturze gąbki. Gąbki pozyskano metodą liofilizacji piany powstałej poprzez spienienie mieszaniny jałowych roztworów żelatyny (20%), alginianu sodu (2% lub 4%) oraz glicerolu (3% lub 5%) w odpowiednich proporcjach (TAB. 1). Doświadczenie wykonano na krwi pobranej na heparynę (10 j/ml krwi) od klinicznie zdrowych świń.

Matryca / Matrix	Żelatyna / Gelatine	Alginian sodu / Sodium alginate	Glicerol / Glycerol
3A	8 cz/part 20%	2 cz/part 2%	3%
5A	8 cz/part 20%	2 cz/part 2%	5%
3B	8 cz/part 20%	2 cz/part 4%	3%
5B	8 cz/part 20%	2 cz/part 4%	5%

TABELA 1.  
TABLE 1.

# STUDIES OF THE REACTIVITY OF LEUKOCYTES AFTER CONTACT WITH GELATINE-ALGINATE MATRIXES

MARIA SZYMONOWICZ<sup>1</sup>, ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL<sup>2</sup>, STANISŁAW PIELKA<sup>1</sup>, JAROSŁAW KRÓL<sup>2</sup>, STANISŁAW GRACZYK<sup>2</sup>, DOROTA HAZNAR<sup>3</sup>, JANUSZ PLUTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH,

2 PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup>WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES, THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,

DEPARTMENT OF PATHOLOGICAL ANATOMY, PATHOPHYSIOLOGY, MICROBIOLOGY AND FORENSIC VETERINARY MEDICINE,

31 NORWID STR., 50-375 WROCLAW, POLAND

<sup>3</sup>WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY, FACULTY OF PHARMACY CHAIR AND DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY,

38 SZEWSKA STR., 50-139 WROCLAW, POLAND

\* E-MAIL: BIOCHEM@CHEKSP.AM.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 29-30]

## Introduction

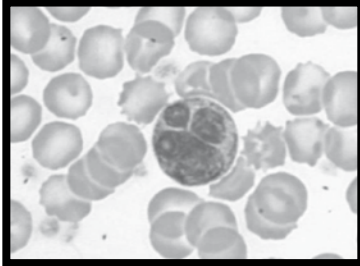
Observation of the relations between material and blood cells, concerning possible morphological and functional changes is necessary for the evaluation of biomaterials assigned for temporal contact with tissues [1,2]. The morphological changes in cells, resulting from the changes of their reactivity are connected, among others, with reorganisation of the cellular cytoskeleton [3]. The appearance of a radial segmentation of the nucleus (RS) in mononuclear blood cells indirectly proves the cytoskeleton reorganization – these are deep clefts in the nucleus gathering concentrically in the centre and appearing as a result of the accelerated depolymerization of microtubules [4-6]. The phagocytic ability of cells enables to remove external pathogens as well as endogenous toxic substances, destroyed cells from the organism [6]. The aerobic processes in phagocytes are more intensive during phagocytosis and the active oxygen derivatives are produced. Because of their toxicity these compounds are used by the cells in performing functions (e.g. the oxygen-dependent system of damaging of microorganisms in granulocytes). On the other hand, they cause an accelerated ageing or damaging of cells (oxidation stress).

Evaluation of the morphological and functional changes of leukocytes after temporal contact of blood with gelatine-alginate matrixes in tests in vitro was the purpose of the study.

## Materials

Four kinds of gelatine-alginate matrixes with the sponge structure were used for the tests. The sponges were obtained by lyophilization of foamed mixture of sterile solutions of gelatine (20%), sodium alginate (2% or 4%) and glycerol (3% or 5%) in the proper proportions (TAB. 1). The test was performed on heparinized blood (10 j/ml) sampled from clinically healthy pigs.

Reaktywność leukocytów oceniano na podstawie:  
- zdolności komórek jednojądrzastych krwi do tworzenia radialnej segmentacji jąder - badania spontanicznej i indukowanej radialnej segmentacji jąder (Radial Segmentation – RS), RYS. 1. [3,4],

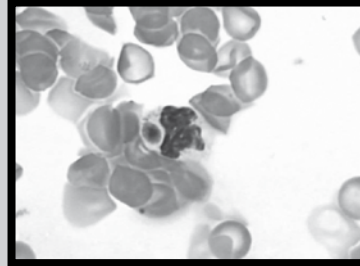


**RYS. 1. Limfocyt z jądrem segmentowanym. - Radial Segmentation (RS). FIG. 1. Radial segmentation of nuclei in lymphocyte - Radial Segmentation (RS).**

- zdolności leukocytów do fagocytozy - badania fagocytozy z użyciem komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, RYS. 2 [4,5],

- aktywności przemian tlenowych w leukocytach - badania zdolności do redukcji błękitu nitrotetrazolowego [6].

The reactivity of leukocytes was evaluated on the basis:  
- the ability of mononuclear blood cells to create radial segmentation of nuclei – tests of the spontaneous and induced radial segmentation of nuclei (Radial Segmentation – RS), FIG. 1 [3,4],



**RYS. 2. Granulocyt obojętnochłonny-wewnątrzsfagocytowana komórka drożdży. FIG. 2. Neutrophilic granulocyte - inside phagocytized yeast cell.**

- the ability of leukocytes for phagocytosis – phagocytic tests with use of yeast cells *Saccharomyces cerevisiae*, FIG. 2 [4,5],

- activity of oxygen metabolic processes in leukocytes – tests of the ability for nitroblue tetrazolium reduction [6].

## Wyniki

Matryce żelatynowo-alginiatowe w kontakcie z krwią ulegały rozpuszczeniu w czasie do 15 min., w związku z czym badania były wykonane na postaci płynnej materiału. Stwierdzono, że oceniane matryce obniżają zdolność komórek jednojądrzastych (limfocytów i monocytów) krwi do tworzenia radialnej segmentacji jądra (RS) i zdolność leukocytów do redukcji błękitu nitrotetrazolowego. Nasilają natomiast proces fagocytozy. Osłabienie zdolności komórek jednojądrzastych do tworzenia RS, po ich czasowym kontakcie z matrycami, świadczy o reorganizacji cytoszkieletu mikrotubularnego tych komórek. Związane jest to prawdopodobnie ze stabilizacją mikrotubuli, warunkowaną spowolnieniem lub zatrzymaniem depolimeryzacji. Obserwowany zwiększony udział odsetkowy komórek (neutrofilii) ze sfagocytowanymi komórkami drożdży przemawia za nasileniem ich aktywności fagocytarnej. Jednak obniżenie zdolności leukocytów do redukcji NBT sugeruje mniejszą jej skuteczność [4].

## Wnioski

Kontakt krwi z matrycami żelatynowo-alginiatowymi nie wywołał zmian morfologicznych w komórkach krwi. Spowodował natomiast zmiany ich reaktywności.

## Podziękowania

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 1260 Akademii Medycznej we Wrocławiu.*

## Results

The gelatine-alginate matrixes after contact with blood were dissolved till 15 minutes. That is why the tests were performed on the liquid form of the material. It was observed that the evaluated matrixes decreased the ability of mononuclear cells of blood (limphocytes and monocytes) to create the radial segmentation of nucleus (RS) and the ability of leukocytes to nitroblue tetrazolium reduction. However, they strengthen the phagocytosis. The decreased ability of mononuclear cells to create RS, after their temporal contact with matrixes, proves the reorganisation of the microtubular cytoskeleton in these cells. It is probably connected with the stabilisation of microtubules conditioned by slowing down or stopping of the depolimerization. The observed increased percentage of cells (neutrophils) with phagocytized yeasts proves their stronger phagocytic activity. However, the decreased ability of leukocytes to reduce NBT suggests smaller efficiency of phagocytosis [4].

## Conclusions

Contact blood with gelatine-alginate matrixes did not cause morphological changes in blood cells. However, it caused changes in their reactivity.

## Acknowledgements

*The work was supported by the project No. 1260 of the Wrocław Medical University.*

## Piśmiennictwo

- [1] Szymonowicz M., Pielka S., Owczarek A, Haznar D., Pluta J.: Study on influence of gelatine-alginate matrixes on the coagulation system and morphotic blood elements. *Macromolecular Symposia* 253, (2007), 71-76.
- [2] Min Ding, Robinson J. M., Behrens B. C., Vandre D.D.: The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leucocytes is a highly dynamic structure. *Eur. J. Cell.Biol.* 66, (1995), 234-245.
- [3] Graczyk S., Madej J., Pliszczak-Król A., Nowak M., Janczyk B.: Leukocytes function in the course of tumor progression in a rat model. *Acta Sci Pol Vet* 3, (2004), 45-51.

## References

- [4] Pliszczak-Król A. Graczyk S. Król J., Janczyk B.: Ocena reaktywności leukocytów krwi obwodowej u szczurów anemizowanych. *Med. Wet.* 62, 12, (2006), 1435-1438.
- [5] Slapnickova M. Berger J.: Rat neutrophil phagocytosis following feed restriction. *Comp. Clin. Path.* 11, (2002), 172-177.
- [6] Dęboczyński W., Pietruska Zofia: Ocena testu NBT w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej. *Pol. Tyg. Lek.* 44 ,14, (1989), 332-333.

# BADANIA NAD ZWIĘKSZENIEM FUNKCJONALNOŚCI EKTOPROTEZ SILIKONOWYCH

E. STODOLAK<sup>1</sup>, H. MATRASZEK<sup>2</sup>, A. GÓRA<sup>1</sup>, S. BŁĄŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

<sup>2</sup>UNIwersytet Jagielloński, Collegium Medicum,  
WYDZIAŁ LEKARSKI, KATEDRA PROTETYKI STOMATOLOGICZNEJ,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW, POLSKA

## Streszczenie

*Silikonowe protezy twarzy (epitezy, ectoprotezy, protezy zewnętrzne) stosowane są u pacjentów, którzy w wyniku zabiegu chirurgicznego, w ramach leczenia chorób nowotworowych, wad wrodzonych, urazu utracili tkanki miękkie i twarde w zakresie twarzoczaszki np. oko, ucho, nos. Rekonstrukcje protezytyczne wykorzystuje się w przypadku, gdy metody chirurgii plastycznej są nieskuteczne lub nie mogą być zastosowane. Istnieją różne metody umocowania ectoprotez. Badania kliniczne i ankietowe wykazały, iż większość pacjentów w pierwszej kolejności wybierała kleje medyczne. Niestety kleje te charakteryzują się krótkim czasem trwałego przytwierdzenia protezy do miejsca ubytku. W pracy zbadano przyczepności trzech rodzajów materiałów silikonowych przytwierdzanych do skóry pacjentów za pomocą klejów i taśm komercyjnych. W celu poprawy adhezji tworzywa zastosowano dwa rodzaje modyfikacji powierzchni. Zbadano wpływ obróbki mechanicznej na powierzchnie silikonów (gwarantujący wzrost chropowatości powierzchni). Zbadano także skuteczność chemicznej metody obróbki powierzchni (trawienie tworzywa w roztworach kwasów nieorganicznych). Celem weryfikacji skuteczności zastosowanych metod modyfikujących powierzchnię opracowano metodę pomiaru adhezji pomiędzy materiałem polimerowym a badanym środkiem klejącym (taśma, klej) wykorzystując w tym celu układ uchwyty uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej.*

**Słowa kluczowe:** ectoprotezy, modyfikacja powierzchni, silikon, adhezja

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 31-35]

## Wprowadzenie

W chirurgii estetycznej i plastycznej stosuje się nowoczesne materiały silikonowe, które umożliwiają odtworzenie uszkodzonych elementów twarzy. Dużą zaletą tych materiałów jest możliwość rekonstrukcji ubytku wraz z jego indywidualnymi cechami: zmarszczkami, naczyniami, znamionami [1,2]. Niestety w trakcie użytkowania ectoprotez wykonanych z silikonu pacjenci borykają się z trudnościami związanymi z trwałym przytwierdzeniem jej do skóry. Stosowane komercyjne środki klejące pozawalają na przytrzymanie ectoprotezy zaledwie przez kilka godzin [3]. Zwiększenie trwałości połączenia pomiędzy materiałem protezy a klejem (lub taśmą) wiąże się ze zmianą parametrów powierzchni tworzywa silikonowego. W zakresie metod modyfikacji powierzchni literatura dysponuje szeregiem metod zmienia-

# INVESTIGATIONS ON IMPROVEMENT OF FUNCTIONALITY OF SILICONE ECTOPROSTHESES

E. STODOLAK<sup>1</sup>, H. MATRASZEK<sup>2</sup>, A. GÓRA<sup>1</sup>, S. BŁĄŻEWICZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>2</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,  
FACULTY OF MEDICINE, DEPARTMENT PROSTHETICS DENTISTRY,  
4 MONTELUPICH STR., 31-155 CRACOW, POLAND

## Abstract

*Silicone facial prostheses (epitheses, ecto-prostheses, external prostheses) are applied for patients who lost soft and hard tissues in craniofacial area, e.g. eye, ear, nose, due to a surgical treatment; tumour diseases treatment; birth defects or injuries. Prosthetic reconstructions are used when plastic surgery methods are ineffective, or cannot be applied. There are various methods of the ecto-prostheses fastening. Clinical tests and surveys revealed that the first choice for the majority of patients is medical glues. However, such glues can provide only short-time fastening of prosthesis to the damaged area. The work presents results of investigations on adhesion of three kinds of silicone materials fastened to patients' skin with the use of commercial glues and adhesive tapes. In order to improve the materials' adhesion two methods of their surface modification were applied. Influence of a mechanical treatment on the materials' surface was investigated. Effectiveness of the surface chemical treatment i.e. etching of the materials with inorganic acids solutions was investigated. In order to verify effectiveness of the applied surface modification methods a testing method of adhesion between the material and the adhesive agent i.e. adhesive tape or glue was developed. The testing method utilised a universal testing machine.*

**Keywords:** ecto-prosthesis, surface modification, silicones, adhesion

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 31-35]

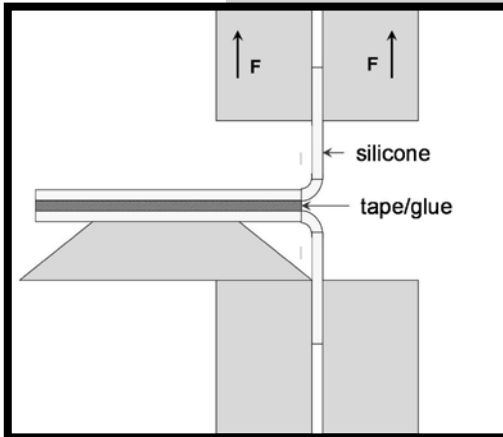
## Introduction

In plastic and esthetical surgery novel silicone materials are applied, which allows to reconstruct damaged parts of a face. Considerable advantage of these materials is an ability to reconstruct the damaged area with all its individual features i.e. wrinkles, vessels, ratings etc. [1,2]. However, during utilization of the silicone prostheses the patients often encounters problems with their fastening to the skin. Applied commercial adhesive agents allow fastening of the prosthesis to the skin only for a few hours [3]. Increase of durability of an interconnection between the prosthesis material and glue or a tape is related to a change of the silicone material surface properties. There exists a wide variety of the silicone material surface modification methods [4]. Due to a medical application of the investigated materials, the modification cannot lead to change of their structure

jących powierzchnię tworzywa silikonowego [4]. Z uwagi na medyczne zastosowanie badanych tworzyw modyfikacja, jakiej poddaje się materiały silikonowe nie może powodować zmiany struktury a tym samym biogodności materiału. Konieczną jest natomiast zmiana charakteru powierzchni tworzywa tylko w obrębie warstwy wierzchniej. W zakresie metod spełniających te warunki pozostają: szczepienie jonowe, naświetlanie plazmą czy nakładanie warstw złożonych z blend polimerowych [5,6]. Niestety przedstawione metody często są pracochłonne lub niepowtarzalne stąd mało praktyczne dla potencjalnego użytkownika (pacjenta, lekarza protetyka).

Problem przytwierdzania protez silikonowych pozostaje, zatem problemem wciąż otwartym ze względu na nietypowy charakter samych tworzyw, jakie stosuje się na ektoprotezy. W niniejszej pracy podjęto próbę modyfikacji powierzchni materiałów silikonowych wykorzystywanych do wykonywania ektoprotez. Próba taka miała na celu zwiększenie adhezji pomiędzy tworzywem a standardowym klejem/taśmą mającym atest Ministerstwa Zdrowia. Zastosowano dwa rodzaje modyfikacji, które w założeniu nie wpływają na stan chemiczny materiału, zmianę struktury czy właściwości biologicznych. Zachowana zostaje biogodność materiału. Zmianie ulega jedynie warstwa wierzchnia, do której przytwierdza się środek klejący.

Spodziewano się, że w procesie modyfikacji fizycznej wzrośnie chropowatość powierzchni ektoprotezy (rozwnięcie powierzchni tworzywa wzrośnie). W efekcie nastąpi wzrost przyczepności do powierzchni protezy silikonowej. Drugą metodą służącą do zmiany charakteru powierzchni była kontrolowana modyfikacja chemiczna. W tym wypadku spodziewano się zmiany tylko w obrębie warstwy wierzchniej materiału protezy. Badane silikonu przetrzymywano w kąpielach ze stężonych kwasów nieorganicznych. W celu zbadania skuteczności zastosowanych metod modyfikujących silikon wykorzystano znane z literatury metody pomiaru kąta zwilżania i energii powierzchniowej. Oprócz tego opracowano metodę pomiaru siły adhezji na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej. Schemat pomiarów adhezji przedstawiono poniżej (RYS. 1). W układ uchwytów maszyny wprowadzono badane materiały, uprzednio sklezione. Stała prędkość poruszania się maszyny i jej czułość pozwoliły na rejestrację siły potrzebnej do oderwania sklejonnych powierzchni materiału. Metoda ta pozwoliła na obliczenie siły adhezji pomiędzy warstwami tworzywa a środkiem klejącym przypadającą na jednostkę nowo powstałej powierzchni.



**RYS. 1. Schemat układu pomiarowego zastosowanego do badania przyczepności.**  
**FIG. 1. Schematic diagram of the adhesion force measurement set.**

and biocompatibility. The surface characteristic should be changed only in the surface layer. The only methods which fulfil these requirements are; ion grafting, plasma exposure or coating with layers of polymer blends [5,6]. However, the above mentioned methods are often time-consuming or non-repeatable, thus impractical for their potential user i.e. patient or a prosthetic doctor.

Thus, the problem of fastening of the silicone prostheses remains still open due to an atypical character of the materials used as ecto-prostheses. The work presents results of the investigations on the modification of the silicone materials used for the ecto-prostheses fabrication. Aim of the investigations was increase of adhesion between silicone materials and typical medical glues/adhesive tapes which have the Certificate of the Health Ministry. In theory, the applied methods of modification should not have changed material's chemical state, its structure or biological properties. Thus, the material's biocompatibility should remain unchanged. The only altered part of the material is its surface layer, to which an adhesive agent is fastened.

It was supposed, that the physical modification process would lead to the higher surface roughness of the ecto-prosthesis i.e. surface area of the material would increase. It would lead to increased adherence to the silicone prosthesis surface. The second method applied to change of the surface characteristics was a controlled chemical modification. In this case, only the change in the surface layer of the prosthesis material was expected. The investigated silicone materials were kept in concentrated inorganic acid solutions. In order to verify effectiveness of the applied silicone modification methods, wetting angle and surface energy of the materials were measured by using standard methods.

Additionally, a method of an adhesion force measurement based on a standard testing machine was developed. Schematic diagram of the adhesion force measurement is presented below (FIG. 1). Two pieces of the silicone material stuck together with the adhesive agent were introduced into the universal testing machine grips set. Constant rate of the machine cross-bar movement (20 mm/min) and its sensitivity allowed recording of a force necessary to tear off the stuck materials surfaces. The method allowed calculation of the adhesion force acting between the materials' surfaces and the adhesive agent which was attributed to a unit area of the newly created surface.

## Materiały i metody

Badania przyczepności materiałów silikonowych mierzonych za pomocą dostępnych środków komercyjnych przed i po modyfikacji (fizycznej, chemicznej) przeprowadzono dla trzech typów tworzyw przeznaczonych na protezy silikonowe. Różnice pomiędzy badanymi materiałami wynikały z warunków prowadzonej polimeryzacji. Zestawienie materiałów posłużyło do nadania im nazw poprawiających czytelność opracowanych wyników:

- Silikon 1, materiał polimeryzowany w 20°C/24h
- Silikon 2, materiał polimeryzowany w 60°C/2h
- Silikon 3, materiał polimeryzowany w 20°C/48h

## Materials and methods

Investigations of adhesion of the silicone materials fastened with commercial adhesive agents before and after the modification (physical or chemical) were carried out for three types of materials destined for silicone prostheses. Differences between the investigated materials resulted from different conditions of their polymerisation:

- Silicone 1, polymerisation at 20°C/24h
- Silicone 2, polymerisation at 60°C/2h
- Silicone 3, polymerisation at 20°C/48h

**TABELA 1. Charakterystyka fizykochemiczna materiałów silikonowych poddanych badaniom.**  
**TABLE 1. Surface physicochemical characteristics of the silicones.**

Material Material	Kąt zwilżania Wetting angle [°]	Energia powierzchniowa Free surface energy [mJ/mm]
Silicone 1	124±1.26	22.4±2.54
Silicone 2	132±2.38	20.9±6.15
Silicone 3	121±3.14	23.6±4.21

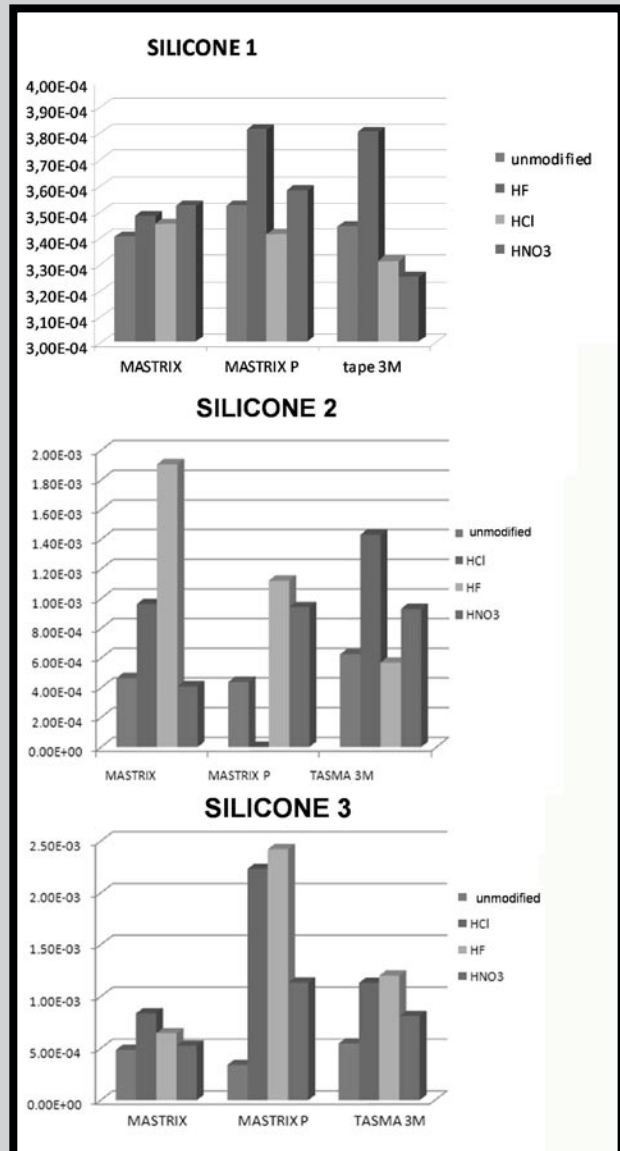
**TABELA 2. Zwilżalność powierzchni materiałów silikonowych poddanych obróbce fizycznej.**  
**TABLE 2. Wettability of the surface of the physically modified silicones.**

Material Mesh	Kąt zwilżania [°] Wetting angle [°]				
	36	120	240	300	2000
Silicone 1	123±2.14	124±4.12	122±2.31	124±1.96	124±1.26
Silicone 2	131±1.89	132±3.18	130±3.82	132±2.92	132±1.56
Silicone 3	122±2.42	121±1.94	120±4.18	121±4.14	122±2.53

**TABELA 3. Charakterystyka fizykochemiczna materiałów silikonowych poddanych trawieniu.**  
**TABLE 3. Surface physicochemical characteristics of the silicones after etching.**

Material Material		Kąt zwilżenia Contact angle [°]	Energia powierzchniowa Surface free energy [mJ/mm]
Silicone 1	HNO <sub>3</sub>	122 ± 1,56	24,4 ± 1,95
	HCl	121± 7,31	26,1 ± 5,92
	HF	120± 3,19	25,9 ± 5,17
Silicone 2	HNO <sub>3</sub>	131 ± 2,81	21,7 ± 3,59
	HCl	127± 4,73	22,3± 5,3
	HF	122 ± 2,7	24,7 ± 3,1
Silicone 3	HNO <sub>3</sub>	120 ± 3,14	24,2 ± 2,41
	HCl	110 ± 2,84	23,8 ± 3,19
	HF	105,7 ± 2,9	22,9 ± 2,8

Dla każdego z wymienionych materiałów przeprowadzono badania wstępne charakteryzujące właściwości fizykochemiczne czystej niemodyfikowanej powierzchni tworzywa. Charakterystykę stanu powierzchni badanych materiałów dokonano metodą dynamicznego pomiaru kąta zwilżenia, używając aparatu DSA 10 Kruss (Niemcy). Swobodną energię powierzchniową wyznaczono metodą Owensa-Wendta. Parą cieczy pomiarowych była woda podwójnie destylowana UHQ i diiodometan (Aldrich Chemical Co., USA). Wyniki badania zebrano w TABELI 1. Wyjściowe materiały poddano modyfikacji fizycznej polegającej na ścieraniu wierzchniej warstwy silikonu materiałami ściernymi o różnych gradacjach (36, 120, 240, 300, 2000). Skuteczność metody przeprowadzono poprzez pomiar kąta zwilżenia metodą pomiaru bezpośredniego (TABELA 2). Brak istotnych zmian w zwilżalności powierzchni badanych materiałów pozwolił na wykluczenie tej metody modyfikacji z dalszych badań. Tworzywa silikonowe pozostały nadal hydrofobowe. Skutkiem tego była rezygnacja z badań nad przyczepnością materiału (klejonego taśmą/klejem) za pomocą maszyny wytrzymałościowej. W dalszej części pracy zastosowano chemiczną obróbkę powierzchni silikonu (trawienie chemiczne). Materiały przetrzymywano przez 15 minut w roztworach kwasów nieorganicznych (65% HNO<sub>3</sub>, 36% HCl, 50% HF). W celu sprawdzenia skuteczności modyfikacji powierzchni wyznaczono kąt zwilżenia po-



**RYS. 2. Wyniki pomiarów przyczepności materiałów silikonowych modyfikowanych powierzchniowo (trawienie w kwasach nieorganicznych; HF, HCl, HNO<sub>3</sub>).**

**FIG. 2. The adhesive force of the chemically modified silicones (etching in inorganic acid solutions: HF, HCl, HNO<sub>3</sub>).**

Pure, unmodified surface of each material was investigated in order to characterise its physicochemical properties. The surface state characteristics analysis was carried out with a dynamic method of wetting angle measurement using DSA 10 (Kruss, Germany) apparatus. The free surface energy was determined using Owens-Wendt method. The measurement liquids couple was double-distilled UHQ water and diiodomethane (Aldrich Chemical Co., USA). The results are presented in TABLE 1. The silicones were physically modified by grinding of their surface layer with abrasive mesh (abrasive papers) of different gradation i.e. 36; 120; 240; 300 and 2000. Effectiveness of the method was verified by a direct measurement of the wetting angle (TABLE 2). Lack of significant changes of the wetting angle of the physically modified silicones, which meant that the silicones still remained hydrophobic, allowed to excluded this method of modification from the further studies. Because of that, the adhesion force measurements were not performed for these materials.



wierzchni silikonu oraz określono energię powierzchniową. Każdy ze zmodyfikowanych materiałów silikonowych (po trawieniu w roztworach kwasów) poddano testom przyczepności w układzie przedstawionym schematem we wstępie (RYS. 1). Badania wykonano na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (Niemcy) w warunkach statycznych. Oszacowano przyczepność materiałów (siłę potrzebną do oderwania materiału z powierzchni jednostkowej). Tworzywa silikonowe pocięto w paski sklejkono za pomocą środków komercyjnych, którymi były:

- klej MASTRIX gum (firmy KRYOLAN),
- klej MASTRIX P (firmy KRYOLAN),
- taśma 3M (firmy 3M).

Taśmę PROSTHETIC odrzucono ze względu na brak przyczepności do wytrawionej powierzchni materiałów silikonowych (sklejone powierzchnie rozchodziły się niezależnie od obecności taśmy czy też nie). Górny uchwyt, poruszały się ze stałą prędkością 20 mm/min. Przyczepność [N/mm<sup>2</sup>] materiałów oszacowano z pomiarów siły zrywającej [N] przypadającej na określoną powierzchnię [mm<sup>2</sup>]. Wybierając zakres gdzie odkształcenie pozostawało na stałym poziomie (20-80 mm) odczytano wartości siły służącej do oderwania sklejkonych powierzchni. Wartość siły adhezji mierzonej w N/mm<sup>2</sup> przedstawiono na RYSUNKACH 2 a,b,c.

## Dyskusja wyników

Z przedstawionych w pierwszej części badań wstępnych na tworzywach silikonowych niemodyfikowanych (stanowiących odniesienie), wynika, że: wszystkie tworzywa są materiałami silnie hydrofobowymi (wysoki kąt zwilżania). Materiały charakteryzują się równocześnie niską energią powierzchniową (ok. 20 mJ/mm<sup>2</sup>). Te dwa parametry: zwilżalność i energia powierzchniowa składają się na niską przyczepności tych materiałów. Stosowane komercyjne środki klejące pomimo swego składu chemicznego (obecności składników organicznych) nie są w stanie zwilżyć odpornej chemicznie powierzchni silikonu.

Zastosowana metoda modyfikacji mechanicznej (ścieranie środkami ściernymi o różnych gradacjach) nie wpływa na poprawę parametrów fizykochemicznych powierzchni (wartość kąta zwilżania przed i po modyfikacji pozostaje na tym samym poziomie (Silikon 1 ok. 123°, Silikon 2 ok. 30°, Silikon 3 ok. 120°). Trawienie chemiczne warstwy wierzchniej różnymi kwasami nieorganicznymi przyniosło poprawę właściwości adhezyjnych. Obserwowana zmiana zwilżalności powierzchni koreluje z wzrostem energii powierzchniowej. Największą zmianę przyczepności i wzrost adhezji tworzywa silikonowego (o ok. 20%) obserwuje się dla pary: Silikon 2 (trawiony HF) łączony za pomocą kleju MASTRIX. Podobne zachowanie widoczne dla pary: Silikon 3 (trawiony HF) i klej MASTRIX P. Mniejszy wzrost siły adhezji silikonu do powierzchni kleju obserwowany jest po zastosowaniu modyfikacji chemicznej roztworem kwasu chlorowodorowego (niewielki spadek kąta zwilżania, TABELA 3). Najniższą przyczepnością charakteryzują się silikonu trawione kwasem azotowym (V).

W przypadku użycia jako złącza adhezyjnego taśmy 3M, najlepsze wartości siły adhezji obserwuje się gdy tworzywo poddaje się trawieniu kwasem HCl.

Niestety zastosowane metody modyfikacji powierzchni materiałów silikonowych w aspekcie poprawy ich właściwości adhezyjnych nie przyniosły pożądaných rezultatów. W wyniku badań stwierdzono poprawę przyczepności tworzywa klejonego środkami komercyjnymi. Wydaje się jednak, że jest ona nadal zbyt niska. Wiąże się to z specyfiką samych materiałów silikonowych, które znane są ze swej odporności na obróbkę chemiczną jak i termiczną.

In the further studies the silicones surfaces were chemically modified by etching. The materials were kept for 15 minutes in inorganic acids solutions i.e.: 65% HNO<sub>3</sub>; 36% HCl, or 50% HF. In order to verify effectiveness of this modification method the wetting angle and the free surface energy were determined (TABLE 3).

Each of the chemically modified silicones was subjected to the adhesive force measurements in the set presented in FIG. 1. The measurements were carried out in static conditions using a universal testing machine Zwick 1435 (Germany). Adherence of the materials i.e. force necessary to tear off a unit area of the material was estimated. The silicones were cut into strips and joined with commercial adhesive materials such as:

- MASTRIX (KRYOLAN, glue)
- MASTRIX P (KRYOLAN, glue)
- 3M adhesive tape (3M)

PROSTHETIC adhesive tape was rejected from the further studies due to lack of adherence to the etched silicone surfaces. An adhesive force [N/mm<sup>2</sup>] of the materials was estimated from the measurements of a tear-off force [N] per specified surface area [mm<sup>2</sup>]. The tear-off force value was read in a region of a constant strain (20-80 mm). Results of the adhesive force measurements are presented in FIG. 2c.

## Discussion

The results of studies of the non-modified silicones (reference materials) indicated that all materials were highly hydrophobic i.e. were characterised by high wetting angle. Simultaneously, the silicones were characterised by a low free surface energy c.a. 20 mJ/mm<sup>2</sup>. These two factors i.e. wettability, and the surface energy were responsible for low adherence of the silicones. Commercial adhesive materials, despite their chemical composition i.e. presence of some organic compounds, are not able to wet a chemical-resistant surface of a silicone.

The applied mechanical modification, i.e. grinding with abrasive materials of different mesh, did not improved physic-chemical parameters of the silicones surfaces. The wetting angle value before and after the modification remained at the same level i.e. for Silicone 1  $\Theta=123^\circ$ ; Silicone 2  $\Theta=30^\circ$ ; Silicone 3  $\Theta=120^\circ$ .

Chemical etching of the silicones surfaces with different inorganic acids solutions improved their adhesive properties. The observed change of the surface wettability correlated with increase of the free surface energy. The highest increase of the silicone adherence for about 20% was observed in case of a pair: Silicone 2 etched with HF and MASTRIX glue. Similar behaviour was observed in other pair: Silicone 3 etched with HF and MASTRIX P glue. Lower increase of the adhesive force acting between a silicone and glue was observed in case of etching with hydrochloric acid (small drop of the wetting angle, TABLE 3). The lowest adhesive force was revealed by the silicones etched with nitric acid. In case of application of 3M type as an adhesive agent the highest values of adhesive force was observed in the silicones etched with HCl acid.

During the investigations some improvement of adherence of the silicone fastened with the commercial adhesive agents was recorded, but still it seemed to be too low. It was related to a character of silicones, which are well-known for chemical and thermal resistance. Next step of investigations on improvement of silicones adherence should be a development of coatings showing better adhesive properties, or improvement of medical glues [7].

Wydaje się również, że w kolejnym kroku prac badawczych nad poprawą przyczepności silikonów może być opracowanie powłok, wykazujących lepszą adhezję lub udoskonalenie stosowanych dotychczas klejów [7].

## Podsumowanie

Zastosowane metody modyfikacji (trawienie chemiczne) nie zmieniły chemicznej struktury powierzchni tworzywa (a więc jej biogodności) ale w niewielkim stopniu poprawiły przyczepność silikonu.

## Piśmiennictwo

- [1] W. Więckiewicz, A. Kopczyński; Dwuetapowa rehabilitacja protetyczna pacjenta po chirurgicznym usunięciu guza szczęki i gałki ocznej – opis przypadku, *Czas Stomatol.* 2000; 53 (4) 248-251.  
 [2] G. Arentowicz, G. Gehl, F. Czerwiński, G. Psut; Rekonstrukcja protetyczna nosa zewnętrznego na bazie śródkostnych wszczepów tytanowych, *Implantoprotetyka* 2006 7(1) 3-9.  
 [3] H. Matraszek, E. Stodolak, S. Błażewicz; Protezy twarzy-aspekty medyczne i technologiczne, *Inżynieria Biomateriałów*, 69-72, (2007), 118-121.  
 [4] Tariq Aziz, M. Waters, R. Jagger; Surface modification of an experimental silicone rubber maxillofacial material to improve

## Summary

The applied modification methods (chemical etching) did not changed chemical structure of the silicones surfaces, and thus their biocompatibility, but improved the silicone adherence only in a small degree.

wettability; *Journal of Dentistry* (2003) 31, 213–216.

## References

- [5] T. Kobayashi, T. Yokota, R. Kato, Y. Suzuki, M. Iwaki, Surface modification of silicone medical materials by plasma-based ion implantation; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 257 (2007) 128–131.  
 [6] T. Kobayashi, R. Katou, T. Yokota, Surface modification of silicone sheets and tubes using plasma-based ion implantation; *Surface & Coatings Technology* 201 (2007) 8039–8042.  
 [7] M. P. Schwartz, F. Cunin, W. Cheung, Chemical modification of silicon surfaces for biological applications; *Physica State Solid* 202, (2005) 8, 1380–1384.

## OCENA CYTOTOKSYCZNOŚCI KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z LAKTYDEM (PLGA) W WARUNKACH IN VITRO

MAGDALENA CIEŚLIK<sup>1</sup>, WOJCIECH KRÓL<sup>2</sup>, ANNA MERTAS<sup>2</sup>, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>3</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO ŚUM W KATOWICACH

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII I IMMUNOLOGII ŚUM W KATOWICACH

<sup>3</sup> KATEDRA BIOMATERIAŁÓW AGH W KRAKOWIE

## Streszczenie

Celem pracy była ocena *in vitro* cytotoksycznego działania bioresorbowalnego kopolimeru glikolidu z laktidem (PLGA) na ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19 poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT) oraz dehydrogenazy mleczanowej (test LDH). Do badań użyto ekstrakt uzyskany po 8 dniach inkubacji kopolimeru PLGA w medium wykorzystywanym do hodowli osteoblastów. Ekstrakt ten następnie kontaktowano przez 24 oraz 48 godzin z zaadherowanymi do dna naczynia hodowlanego osteoblastami. Po upływie założonego czasu inkubacji zarówno test MTT, jak i test LDH nie wykazał cytotoksycznego działania kopolimeru PLGA na ludzkie komórki kościotwórcze.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, kopolimer PLGA, cytotoksyczność, test MTT, test LDH, osteoblasty ludzkie, badania biologiczne  
 [Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 35-39]

## CYTOTOXICITY OF POLYLACTIDE-CO-GLYCOLIDE (PLGA) – EVALUATION IN VITRO

MAGDALENA CIEŚLIK<sup>1</sup>, WOJCIECH KRÓL<sup>2</sup>, ANNA MERTAS<sup>2</sup>, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>3</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT AND SECTION OF DENTAL MATERIALS SCIENCE OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>2</sup> DEPARTMENT AND SECTION OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AGH-UST, CRACOW

## Abstract

The aim of the work was to evaluate *in vitro* the cytotoxic effect of bioresorbable polylactide-co-glycolide (PLGA) on the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line by measuring the activity of mitochondrial dehydrogenase (MTT test) and lactate dehydrogenase (LDH test). The research made use of an extract obtained after 8 days of PLGA incubation in a medium used for osteoblast culturing. The extract was then brought into contact with osteoblasts adhered to the bottom of the culture vessel for 24 and 48 hours. After the set incubation time neither the MTT test nor the LDH test showed a cytotoxic effect of PLGA on human osteogenic cells.

**Keywords:** biomaterials, copolymer PLGA, cytotoxicity, MTT assay, LDH assay, human osteoblasts, biological evaluations

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 35-39]

Z względu na dobrą biogodność i biostabilność polilaktydów (PLLA, PDLA oraz PDLLA), poliglikolidu (PGA) i ich kopolimerów (PLGA) obserwuje się ciągle wzrost zainteresowania tymi materiałami w codziennej praktyce klinicznej [1,7,16,17]. Znajdują głównie zastosowanie jako wszczepy chirurgiczne, zaopatruje się nimi uszkodzenia niektórych organów wewnętrznych, a także służą jako nośniki leków w procesach ich kontrolowanego uwalniania. Ponadto wykorzystuje się je w takich dziedzinach medycyny jak inżynieria tkankowa czy genetyczna [4,11,13].

Z racji tego, iż materiały te po spełnieniu swojej funkcji w organizmie ludzkim ulegają rozkładowi czas degradacji jest jednym z istotnych parametrów określających ich biologiczną przydatność i jakość. Szybkość rozkładu materiałów polimerowych zależy między innymi od ich stopnia krystaliczności, masy molowej, pH, temperatury otoczenia czy porowatości. W przypadku kopolimerów PLGA duże znaczenie ma ponadto stosunek procentowy poliglikolidu do polilaktidu oraz sposób ich otrzymywania [13]. Ma to szczególne znaczenie podczas stosowania tego typu biomateriałów w technice leczenia ubytków kostnych zwanej sterowaną regeneracją tkanki (guided tissue regeneration-GTR) czy bardziej ściśle - tkanki kostnej (guided bone regeneration-GBR) [15]. Założeniem tej metody jest stworzenie najbardziej optymalnych warunków pozwalających na szybką regenerację ubytku kostnego. Do tego typu zastosowań wykorzystuje się między innymi polimerowe membrany o odpowiedniej porowatości otwartej, zawierające w warstwach powierzchniowych fazę, która wspomaga kościotworzenie [10,18]. Biopolimery o kontrolowanym czasie resorpcji odgrywają również istotną rolę w trudnych do leczenia i zazwyczaj wymagających długotrwałej kuracji antybiotykami zakażeniach kości. Materiał wraz z skutecznym lekiem deponuje się bezpośrednio do ogniska zakażenia, co zwiększa skuteczność leczenia i eliminuje skutki ogólnego, długotrwałego działania medykamentu na cały organizm [8,9].

W celu określenia, czy dany biomateriał zawiera substancje biologicznie szkodliwe przeprowadza się ocenę jego cytotoxyczności. Służą ku temu wystandaryzowane testy o odpowiedniej czułości. Wyniki tychże badań mogą być wczesnym ostrzeżeniem, że badany materiał zawiera substancje potencjalnie cytotoxyczne w stężeniu większym aniżeli jest to dopuszczalne [14].

W ramach niniejszej pracy dokonano oceny cytotoxyczności bioresorbowalnego kopolimeru glikolidu z laktidem - PLGA wobec ludzkich komórek kościotwórczych w warunkach in vitro.

## Materiał i metody

### Materiał

Ocenie stopnia cytotoxyczności poddano kopolimer glikolidu z laktidem (18:82). Syntezę kopolimeru prowadzono stosując jako inicjator acetyloacetonian cyrkonu charakteryzujący się niską toksycznością [2]. Do badań wykorzystano wysterylizowane metodą plazmową próbki PLGA w kształcie cienkich krążków o średnicy 16 mm, dostosowanych rozmiarem do dołków płytek hodowlanych, w których przeprowadzono eksperyment. Próbkę pozyskano z Katedry Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Eksperyment przeprowadzono wykorzystując ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19 zakupione w American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), numer katalogowy CRL-11372.

## Introduction

Due to their high biocompatibility and biostability, poly lactides (PLLA, PDLA and PDLLA), polyglycolide (PGA) and their copolymers (PLGA) are the focus of a growing interest as materials for everyday clinical practice [1,7,16,17]. They are used mainly as surgical implants but also to dress lesions of certain internal organs, and as drug carriers for controlled drug release. Furthermore, they find implementation in such medical disciplines as tissue and genetic engineering [4,11,13].

Since the materials in question decompose once their function in the human body has been accomplished, the degradation time is one of the vital parameters determining their biological usefulness and quality. The decomposition speed of polymer materials depends among others on the level of their crystallinity, molecular mass, pH, ambient temperature and porosity. In the case of PLGA copolymers the polyglycolide – polylactide ratio and the method of their obtaining are also very important [13]. This is of particular significance when using these biomaterials in treating bone defects, in the so-called guided bone regeneration (GBR) or more precisely guided osseous tissue regeneration (GTR) [15]. The aim of this method is to create optimal conditions enabling quick regeneration of bone defects. To this end, among others, polymer membranes of appropriate porosity and containing in surface layers an osteogenesis-supporting phase are used [10,18]. Biopolymers of controlled resorption time also play an important part in difficult to treat bone infections which usually require a long-term treatment with antibiotics. The material, together with the appropriate drug is deposited directly in the focus of the infection, which increases treatment efficacy and eliminates the impact of general prolonged effect of the medicament on the entire system [8,9].

In order to determine whether a given biomaterial contains biologically harmful substances, its cytotoxicity is evaluated with standardized tests of appropriate sensitivity. The results of these examinations may constitute an early warning that the given material contains potentially cytotoxic substances whose concentration is higher than the admissible norm [14].

This work evaluates in vitro the cytotoxicity of bioresorbable polylactide-co-glycolide - PLGA to human osteogenic cells.

## Material and methods

### Material

Specifically, the cytotoxicity of copolymer of glycolide and lactide (18:82) was evaluated. The synthesis of the copolymer was conducted in the presence of the low-toxicity zirconium acetylacetonate as the initiator [2]. The research made use of disc-shaped plasma-sterilised PLGA samples of 16 mm in diameter, dimension-wise matching the wells of the culture plates in which the experiment was carried out. The samples were obtained from the Department of Biomaterials of the AGH University of Science and Technology in Cracow.

The experiment was carried out with the use of the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line purchased from American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), catalogue number CRL-11372.

### Methods

The experimental part of the work was conducted at the Faculty and Institute of Microbiology and Immunology of the Medical University of Silesia in Zabrze.

## Metody

Część doświadczalną niniejszej pracy przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrzu.

Hodowlę komórek prowadzono w plastikowych butelkach o pojemności 50ml (Nunc A/S Roskilde). Jako medium hodowlane stosowano podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium oraz podłoże Ham's F12 połączone w proporcji 1:1 (bez czerwieni fenolowej i antybiotyków) z dodatkiem 2,5mM L-glutaminy oraz 0,3mg/ml G418 Sulphate i 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) inaktywowanej termicznie. Komórki hodowano w sposób ciągły w temperaturze 34°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Komórki wykorzystane do badań były po 6 pasażu, co gwarantowało ich stabilność i stałe tempo proliferacji.

Do testów oceniających cytotoksyczność kopolimeru PLGA wykorzystano jego ekstrakt uzyskany poprzez 8-dniową inkubację próbek badanego biomateriału umieszczonych na dnie dołków 24-dołkowej płytki do hodowli komórek (Nunc A/S Roskilde) w 2 ml medium hodowlanego o składzie identycznym jak medium do hodowli osteoblastów. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Następnie objętość 0,2 ml uzyskanego w ten sposób ekstraktu oraz jego kolejnych rozcieńczeń w medium hodowlanym (rozcieńczenia w postępie geometrycznym od 1:2 do 1:128) dozowano do osteoblastów hFOB 1.19 zaadherowanych do dna dołków 96-dołkowej płytki do hodowli komórkowych (Nunc A/S Roskilde, Dania). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Czas inkubacji dla dwóch równolegle prowadzonych eksperymentów wynosił: 24 godziny oraz 48 godzin. Ocenę cytotoksycznego działania kopolimeru PLGA na ludzkie osteoblasty dokonano poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT) [5,12] oraz dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) [6] wykonując każde z oznaczeń w trzech niezależnych powtórzeniach.

## Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (test LDH)

Dehydrogenaza mleczanowa uwalniana jest z cytoplazmy do medium hodowlanego w wyniku uszkodzenia błony komórkowej i lizy komórek. Wzrost aktywności LDH w supernatantach hodowli komórkowych koreluje z odsetkiem martwych komórek. Wykorzystano test cytotoksyczności, którego zasada opiera się na dwóch reakcjach. Pierwsza z nich to redukcja NAD<sup>+</sup> do NADH/H<sup>+</sup> katalizowanej przez LDH konwersji mleczanu do piroglonianu. Kolejna reakcja to katalizowane przez diaforezę przeniesienie H/H<sup>+</sup> z NADH/H<sup>+</sup> na sól tetrazolową INT (chlorek 2-[2-jodofenyl]-3-[4-nitrofenyl]-5-fenylotetrazolowy), która jest redukowana do formazanu. Wzrost aktywności LDH jest proporcjonalny do stężenia formazanu. Rozpuszczalny w wodzie, barwiący się na czerwono formazan wykazuje maksimum absorpcji dla długości fali 490 nm, podczas gdy żółty roztwór soli tetrazolowej INT nie wykazuje absorpcji dla tej długości fali. Oznaczenie wykonano w 96 dołkowych płytkach według procedury podanej przez producenta [6]. Procent cytotoksyczności CT [%] obliczano posługując się następującym wzorem, do którego wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości A<sub>medium</sub> (absorbancja medium hodowlanego):

$$CT [\%] = \left[ \frac{(A_b - A_{ekstr}) - A_{nk}}{(A_{wk} - A_{nk})} \right] \times 100\%$$

gdzie:

A<sub>b</sub> – absorbancja próbki badanej, A<sub>wk</sub> – absorbancja kontroli wysokiej, czyli wartość całkowitego uwolnienia LDH (maksymalne uwolnienie LDH po dodaniu do hodowli komórek 1%

The cells were cultured in plastic 50 ml bottles (Nunc A/S Roskilde). Dulbecco's Modified Eagle's Medium was used together with Ham's F12 in proportion 1:1 (without phenol red and antibiotics) with the addition of 2,5 mM L-glutamine, 0,3 mg/ml G418 Sulphate and 10% foetal bovine serum (FBS) inactivated thermally. The cells were cultured in a continuous manner at a temperature of 34°C, air containing 5% CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. The cells used in the research were after 6 passages, which guaranteed their stability and a constant rate of proliferation.

To evaluate PLGA's cytotoxicity tests were performed on the copolymer's extract obtained through an 8-day incubation of samples of the studied biomaterial positioned at the bottom of the wells of a 24-well cell culture plate (Nunc A/S Roskilde) in 2ml of medium identical to that used to culture the osteoblasts. The samples were incubated at a temperature of 37°C, air containing 5%CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. Next, 0,2 ml of the obtained extract and its further dilutions in the growth medium (dilutions in geometric progression from 1:2 to 1:128) were added to the hFOB 1.19 osteoblasts adhered to the bottom of the wells of a 96-well cell culture plate (Nunc A/S Roskilde, Denmark). The plates were incubated at a temperature of 37°C, air containing 5% CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. The incubation time of the two parallel experiments was: 24 hours and 48 hours. The evaluation of PLGA's cytotoxic effect on human osteoblasts was performed by measuring the activity of mitochondrial dehydrogenase (MTT assay) [5,12] and lactate dehydrogenase (LDH assay) [6]. Each assay was independently repeated thrice.

## LDH (lactate dehydrogenase) release assay

Lactate dehydrogenase is released from the cytoplasm into the growth medium as a result of a damage to the cellular membrane and cellular lysis. Increased LDH activity in the supernatants of cell cultures correlates with the percentage of dead cells. The cytotoxicity test used in this research is based on two reactions. The first is the reduction of NAD<sup>+</sup> to NADH/H<sup>+</sup> catalyzed by LDH conversion of lactate to pyruvate. The other reaction is the transfer of H/H<sup>+</sup>, catalyzed by diaphoresis, from NADH/H<sup>+</sup> to tetrazolium salt INT (2-[2-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride), which is then reduced to formazane. The increase in LDH activity is proportionate to formazane concentration. Water soluble, staining red, formazane displays maximum absorption at wavelength 490nm, whilst the yellow solution of tetrazolium salt INT does not show absorption at this wavelength. The assay was performed in 96-well plates, following the procedure recommended by the manufacturer [6]. The cytotoxicity percentage CT [%] was calculated with the following formula (the values of particular absorbances had previously been diminished by subtracting A<sub>medium</sub> - absorbance of the growth medium):

$$CT [\%] = \left[ \frac{(A_s - A_{extr}) - A_{lc}}{(A_{hc} - A_{lc})} \right] \times 100\%$$

where:

A<sub>s</sub> – absorbance of the studied sample, A<sub>hc</sub> – absorbance of high control, i.e. the value of total LDH release (maximum LDH release after adding of 1% solution of Triton X-100 to the cell culture), A<sub>extr</sub> – absorbance of the control of the studied extract, A<sub>lc</sub> – absorbance of low control, i.e. the value of the spontaneous LDH release (spontaneous LDH release during native cell culturing).

## MTT (mitochondrial dehydrogenase) activity assay

After 24- or 48-hour incubation with the studied PLGA extract sample, the cells used in the experiment were rinsed and then the MTT solution was added, thereby obtaining the final concentration of 1,1mM. The culturing was continued for 4 hours in the same conditions as before.

roztworu Tritonu X-100),  $A_{nk}$  – absorbancja kontroli niskiej, czyli wartość spontanicznego uwolnienia LDH (spontaniczne uwalnianie LDH podczas hodowli komórek natiwnych),  $A_{ekstr}$  – absorbancja kontroli badanego ekstraktu.

### Pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT)

Wykorzystane do eksperymentu komórki po 24- lub 48-godzinnej inkubacji z badaną próbką ekstraktu PLGA odplukiwano, a następnie dodawano do nich roztwór MTT uzyskując końcowe stężenie 1,1 mM. Hodowlę kontynuowano przez 4 godziny w identycznych warunkach jak poprzednio. Po tym czasie komórki odwirowywano, supernatant zlewano, a do zaadherowanych komórek dodawano DMSO w celu ekstrakcji formazanu MTT z komórek. Supernatant pobierano po 20 minutach i oznaczano jego absorbancję przy długości fali 550 nm stosując automatyczny czytnik płytek [5,12]. Procent cytotoksyczności CT [%] obliczano posługując się następującym wzorem, do którego wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości ADMSO:

$$CT [\%] = 100\% - (A_b \times 100\%) / A_k$$

gdzie:

$A_b$  – absorbancja próbki badanej,  $A_k$  – absorbancja próbki kontrolnej, ADMSO – absorbancja DMSO.

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane w trakcie badań wyniki wskazują, iż badany kopolimer PLGA nie wywiera działania cytotoksycznego na osteoblasty ludzkiej linii hFOB 1.19. Po 48 godzinach inkubacji komórek w obecności ekstraktu badanego materiału uzyskano zerowy procent cytotoksyczności. Taki rezultat otrzymano zarówno po przeprowadzeniu testu MTT jak i LDH. Niewiele mniejsza przeżywalność zastosowanych komórek miała miejsce po 24 godzinach eksperymentu. W przypadku pierwszego testu cytotoksyczność wynosiła 3,3% a w przypadku drugiego 11%. Uzyskane rezultaty świadczą, iż kopolimer PLGA nie ma większego działania toksycznego na użyte komórki ludzkie aniżeli dopuszcza to poziom kliniczny [14]. Podobne wnioski wysunęli autorzy pracy, którzy oceniając biokompatybilność membran wykonanych z polilaktidu, zastosowali identyczną jak w niniejszej pracy linię osteoblastów ludzkich. Określana przez nich przeżywalność komórek (barwienie błękitem trypanu) była nieznacznie mniejsza po 24 godzinach kontaktu materiału z komórkami aniżeli po 72 godzinach. Zastosowany przez nich polilaktyd nie wykazał toksycznego działania na osteoblasty, ponadto wpływał na dobrą ich proliferację i adhezję do podłoża [3]. Simon i wsp. analizowali przeżywalność komórkową w obecności kompozytu złożonego z kopolimeru PLGA i fosforanu wapniowego. Wykorzystując w tym celu test MTT również wykazali, iż materiał ten jest w pełni biokompatybilny i nietoksyczny względem zastosowanej przez nich linii osteoblastów MC3T3-E1 [17]. Autorzy innej pracy użyli w swoich badaniach biologicznych trzy rodzaje podłoży uzyskanych metoda łączenia włókien z kopolimeru glikolidu z L-laktydem (16:84). Ludzkie komórki kościotwórcze z linii komórkowej MG 63 kontaktowano bezpośrednio (4 dni) z badanymi materiałami i mierzono całkowitą liczbę komórek oraz liczbę żywych komórek przylegających do próbek. Liczba żywych komórek na wszystkich podłożach była dowodem ich nietoksycznego oddziaływania, natomiast różnice w ich całkowitej ilości wynikały z mikrostruktury podłoży (porowatości) [4].

Innym podejściem do tematu badań biogodności materiałów jest praca Montjovent'a i wsp. Autorzy udowodnili, iż adhezja, proliferacja i różnicowanie się komórek na pod-

After that time the cells were centrifuged, the supernatant was decanted, and DMSO was added to the adhered cells with a view to extract MTT formazane from the cells. The supernatant was collected after 20 minutes and its absorbance was determined at a wavelength of 550 nm implementing an automatic plate reader [5,12]. The cytotoxicity percentage CT [%] was calculated with the following formula, where the values of particular absorbances had previously been diminished by subtracting ADMSO:

$$CT [\%] = 100\% - (A_s \times 100\%) / A_c$$

where:

$A_s$  – absorbance of the studied sample,  $A_c$  – absorbance of the control sample, ADMSO – DMSO absorbance.

## Results and discussion

The obtained results show that PLGA does not have a cytotoxic effect on the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. After 48 hours of cell incubation in the presence of the extract of the studied material, zero percent cytotoxicity was revealed. This result was obtained after performing both the MTT and the LDH tests. There was a slightly lower cell survival rate after 24 hours of the experiment. In the case of the first test, the cytotoxicity equalled 3.3% and in the case of the other 11%. The obtained results demonstrate that PLGA does not have a higher than clinically admissible toxic effect on human cells [14]. Similar conclusions were drawn by authors who used the same as in this research human osteoblastic cell line to evaluate the biocompatibility of polylactide membranes. The cell survival rate (trypan blue staining) was slightly lower after a 24-hour contact of the material with the cells than after 72 hours. The polylactide used in their study did not show a toxic effect on the osteoblasts; moreover, it enhanced proliferation and adhesion to the medium [3]. Simon et al. analyzed the cell survival rate in the presence of a composite made of PLGA and calcium phosphate. Using the MTT test they also showed that the material in question was fully biocompatible and non-toxic to the MC3T3-E1 osteoblastic cell line used in their study [17]. The authors of another study in their biological examination used three types of media obtained by combining fibres of glycolide copolymer with L-lactide (16:84). Human osteogenic cells of the MG 63 cell line were brought into direct contact (4 days) with the studied materials and the total cell number was calculated as well as the number of living cells adhering to the samples. The number of living cells on all media confirmed non-toxicity; the differences in total cell numbers were caused by medium microstructure (porosity) [4].

Another approach to the question of material biocompatibility is presented by Montjovent et al. The authors proved that cellular adhesion, proliferation and differentiation on a polymer medium depends not only on its level of porosity but also on the type of cells brought into contact with it. In their research they compared the effect of five polylactide-based media of a varying degree of porosity on foetal and mature human osteoblasts. They demonstrated that foetal cells have a higher osteogenic potential, penetrate into the polymer medium more quickly and are conducive to better proliferation as compared to mature cells [11]. The above-cited studies confirm the considerable interest in materials based on polylactide, polyglycolide and their copolymers in the context of medical implementation. Furthermore, they demonstrate the effect of various factors (chemical composition, method of obtaining, porosity, structure as well as the participation and presence of additional ingredients) on the material's final biological properties.

tożu polimerowym są uzależnione nie tylko od jego stopnia porowatości, lecz także od rodzaju skontaktowanych z nim komórek. W swoich badaniach porównali wpływ pięciu podłoży na bazie polilaktydu o różnym stopniu porowatości na płodowe i dojrzałe osteoblasty ludzkie. Udowodnili, iż komórki płodowe mają większy potencjał kościotwórczy, szybciej wnikają w podłoże polimerowe i sprzyjają lepszej proliferacji w porównaniu z komórkami dojrzałymi [11]. Przykłady przedstawionych prac są dowodem na duże zainteresowanie materiałami na bazie polilaktydu, poliglikolidu i jego kopolimerów w kontekście zastosowań medycznych. Świadczą ponadto o wpływie różnych czynników (skład chemiczny, sposób otrzymywania, porowatość, budowa strukturalna czy udział i obecność poszczególnych składników dodatkowych) na końcowe właściwości biologiczne materiału.

## Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych in vitro badań biologicznych kopolimeru glikolidu z laktydem wynika, iż biomateriał ten jest biozgodny. Brak jego cytotoksycznego wpływu na ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19 zachęca do dalszych badań zmierzających do możliwości jego praktycznego stosowania między innymi w chirurgii kostnej.

## Conclusions

Based on the conducted biological in vitro examination of PLGA, it follows that this biomaterial is biocompatible. The absence of cytotoxic effect on the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line is encouraging for further research aiming at its practical implementation, among others in bone surgery.

## Piśmiennictwo

- [1] Anthanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical application of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 1996, 17, 93-102.
- [2] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grzeb P., Kryczka T., Ryba M., Walski M.: Kopolimery laktydu, glikolidu i ε-kaprolaktonu niezawierające metali ciężkich. Synteza własności i zastosowanie w procesie kontrolowanego uwalniania analogów nukleozydów. *Inżynieria Biomateriałów*, 2002, 23-25, 21-22.
- [3] Bilir A., Aybar B., Tanrikulu S.H., Issever H., Tuna S.: Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. *Clinical Oral Implants Research*, 2007, 18, 46-52.
- [4] Buczyńska J., Pamuła E., Błażewicz S., Bacakova L., Parizek M., Chlupac J., Mikołajczyk T., Boguń M., Dobrzyński P.: Włókniste podłoża dla inżynierii tkankowej kości: hodowle MG 63 w warunkach statycznych i dynamicznych. *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 65-66, 1-6.
- [5] Cell proliferation kit (MTT). Instruction manual. Version 3. Roche Applied Science, Germany, 2003.
- [6] Cytotoxicity Detection Kit (LDH). Instruction manual. Roche Applied Science, Germany, Version July 2005.
- [7] Ishaug-Riley S.L., Crane-Kruger G.M., Yaszemski M.J., Mikos A.G.: Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 1998, 19, 1405-1412.
- [8] Jain R.A.: The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 2000, 2475-2490.
- [9] Jedliński Z., Juźwa M.: Leki cytotoksyczne na matrycach polimerowych. Nowe perspektywy w terapii nowotworów. *Inż. Biomat.*, 2001, 17-19, 21.

## References

- [10] Lorenzoni M., Pertl C., Keil C., Wegscheider W.A.: Treatment of peri-implant defects with guided bone regeneration: a comparative clinical study with various membranes and bone grafts. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 1998, 13, 639-646.
- [11] Montjovent M.O., Mathieu L., Hinz B., Applegate L.L., Bourban P.E., Zambelli P.Y., Manson J.A., Pioletti D.P.: Biocompatibility of bioresorbable poly(L-lactic acid) composite scaffolds obtained by supercritical gas foaming with human fetal bone cells. *Tissue Engineering*, 2005, 11/12, 1640-1649.
- [12] Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65, 55-63.
- [13] Pamuła E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M.: Bioresorbowalne porowate podłoża dla inżynierii tkankowej z kopolimeru glikolidu z L-laktydem: wpływ mikrostruktury na osteoblasty in vitro. *Inżynieria Biomateriałów*, 2003, 30-33, 95-99.
- [14] PN-EN ISO 10993-5: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności: metody in vitro, marzec 2001.
- [15] Rothamel D., Schwarz F., Sculean A., Herten M., Scherbaum W., Becker J.: Biocompatibility of various membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblasts-like cells. *Clinical Oral Implants Research*, 2004, 15, 443-449.
- [16] Schakenraad J.M., Dijkstra P.J.: Biocompatibility of poly(DL-lactic acid/glycine) copolymers. *Clin Mater*, 1991, 7, 253-269.
- [17] Simon C.G., Khatri C.A., Wight A.A., Wang F.W.: Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002, 20, 473-482.
- [18] Stodolak E., Czajkowska B., Mikołajczyk T., Błażewicz M., Wołowska-Czapnik D.: Wpływ parametrów powierzchni kompozytowych materiałów włóknistych na odpowiedź komórkową. *Inżynieria Biomateriałów*, 2006, 54-55, 19-23.

## WPŁYW WZMOCNIONEGO WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI KOPOLIMERU GLOKOLIDU Z LAKTYDEM NA ODPOWIEDŹ KOMÓRKOWĄ

MAGDALENA CIEŚLIK<sup>1</sup>, WOJCIECH KRÓL<sup>2</sup>, ANNA MERTAS<sup>2</sup>, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>3</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO ŚUM W KATOWICACH

<sup>2</sup> KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII I IMMUNOLOGII ŚUM W KATOWICACH

<sup>3</sup> KATEDRA BIOMATERIAŁÓW AGH W KRAKOWIE

### Streszczenie

W pracy dokonano oceny cytotoksycznego wpływu wzmocnionego włóknami węglowymi kopolimeru glikolidu z laktydem (PLGA+CF) na ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19. Przeprowadzono w tym celu pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej metodą MTT oraz dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) w warunkach *in vitro*. Oba testy nie wykazały toksycznego działania badanego kompozytu na ludzkie komórki kościotwórcze.

**Słowa kluczowe:** biomateriały, kopolimer PLGA, włókna węglowe, cytotoksyczność, test MTT, test LDH, osteoblasty ludzkie, badania biologiczne

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 40-44]

### Wprowadzenie

Spośród szerokiej gamy materiałów rekonstrukcyjnych stosowanych obecnie w medycynie zdecydowanie najlepsza wydaje się nadal tkanka własna [7,8]. Wykorzystywanie w praktyce chirurgicznej przeszczepów autogennych związane jest jednak z wykonaniem dodatkowego zabiegu chirurgicznego. Wydłuża to czas trwania operacji i jest dodatkowym obciążeniem dla pacjenta. W wielu specjalnościach medycznych stosuje się bioaktywne preparaty na bazie odbiałczonych kości zwierzęcych [14]. Pozwala to na uniknięcie wymienionych niedogodności, lecz niesie zarazem ryzyko przeniesienia do organizmu ludzkiego bakterii, wirusów czy niektórych chorób odzwierzęcych. Uniknięciu tego typu zagrożeń sprzyja stosowanie w celach odtwórczych bioaktywnych ceramicznych materiałów syntetycznych (fosforan trójwapniowy, hydroksyapatyt czy bioszkło) o dużym podobieństwie właściwości biologicznych do kości ludzkich [10, 15, 17]. Materiały te charakteryzują się stosunkowo wysoką sztywnością i kruchością, co jest dużym utrudnieniem w formowaniu wymiarowo zaplanowanych gotowych wszczepów medycznych. Ogranicza to zarazem w znacznym stopniu ich użyteczność. Zdecydowanie łatwiejsze w przetwórstwie są biomateriały polimerowe. Szczególne miejsce w tej grupie materiałów zajmują biopolimery resorbowalne takie jak polilaktyd (PLLA, PDLA oraz PDLLA), poliglikolid (PGA) czy ich kopolimery (PLGA). Z uwagi na ich dobrą biogodność i biostabilność znajdują zastosowanie w takich specjalnościach medycznych jak inżynieria tkankowa i genetyczna, farmakologia, chirurgia czy stomatologia [1, 13, 15].

## THE IMPACT OF POLYLACTIDE-CO-GLYCOLIDE REINFORCED WITH CARBON FIBRES ON CELLULAR RESPONSE

MAGDALENA CIEŚLIK<sup>1</sup>, WOJCIECH KRÓL<sup>2</sup>, ANNA MERTAS<sup>2</sup>, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ<sup>3</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>3</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT AND SECTION OF DENTAL MATERIALS SCIENCE OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>2</sup> DEPARTMENT AND SECTION OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY OF MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, KATOWICE

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AGH-UST, CRACOW

### Abstract

*This work evaluates the cytotoxic impact of poly-lactide-co-glycolide reinforced with carbon fibres (PLGA+CF) on the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. To this end the levels of mitochondrial dehydrogenase (MTT method) and lactate dehydrogenase (LDH test) were measured in vitro. Neither test showed a toxic effect of the studied composite on the human osteogenic cells.*

**Keywords:** biomaterials, copolymer PLGA, carbon fibres, cytotoxicity, MTT assay, LDH assay, human osteoblasts, biological evaluations

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 40-44]

### Introduction

Of the wide range of reconstructive materials currently used in medicine, autogenous tissue still seems by far the best [7,8]. However, the use of autogenous transplants involves an additional surgical procedure, which impacts the duration of the surgery and constitutes an additional strain on the patient. Numerous medical specialisations make use of bioactive preparations based on deproteinised animal bones [14]. Although they obviate the above-mentioned inconveniences, nevertheless they carry a risk of transmission to the human body of bacteria, viruses or certain zoonoses. Such risks can be prevented by reconstructive implementation of bioactive ceramic synthetic materials (tricalcium phosphate, hydroxyapatite or bioglass) whose biological properties are very similar to those of human bones [10, 15, 17]. These materials are characterised by relatively high rigidity and fragility, which is a considerable impediment in forming ready medical implants of specified dimensions and therefore their applications are limited. Decidedly easier to process are polymeric biomaterials. Within this group of materials a special place is held by resorbable biopolymers, such as polylactide (PLLA, PDLA and PDLLA), polyglycolide (PGA) and their copolymers (PLGA). Due to their high biocompatibility and biostability they are widely used in tissue and genetic engineering, pharmacology, surgery and dentistry [1, 13, 15].

More and more research is carried out on combining biocompatible materials into composites with a view to enhance the durability parameters of the final product, as well as to broaden their functionality [4, 15]. To this end various natural or synthetic fillers are used, such as carbon fibres [16] or fibres made of the same material as the polymer matrix [18], which affect mainly the bioactivity of the com-

Coraz częściej prowadzone są badania nad łączeniem biozgodnych materiałów w kompozyty celem ulepszenia parametrów wytrzymałościowych końcowego produktu, jak również w celu rozszerzenia ich funkcji [4,15]. Stosuje się w tym celu różnego rodzaju wypełniacze pochodzenia naturalnego bądź syntetycznego. Przykładem mogą być włókna węglowe [16] czy włókna wykonane z tego samego materiału co matryca polimerowa [18], a także wpływające głównie na bioaktywność powstałego z ich udziałem kompozytu, bioszklę czy hydroksyapatyt [10,15]. Zwłaszcza kompozyty polimerowo-włókniste są często postrzegane w inżynierii materiałowej jako alternatywa dla wstępców metalicznych. Obecność włókien w osnowie polimerowej pozwala na modyfikacje w obszarze wytrzymałości, modułu sprężystości czy kruchości materiału. Daje równocześnie możliwość otrzymywania wstępców o biomimetycznej anizotropii właściwości mechanicznych. Rozprowadzona w matrycy polimerowej faza modyfikująca wpływa ponadto na energię powierzchniową i mikrostrukturę materiału [16].

Szczególne miejsce w tworzeniu kompozytów zajmują biozgodne włókna węglowe. Ich obecność w polimerach pozwala na otrzymanie materiałów charakteryzujących się korzystną relacją wytrzymałości i sprężystości w odniesieniu do gęstości, a także są przepuszczalne dla promieni rentgenowskich. Wyzwaniem dla inżynierii tkankowej jest ponadto wykorzystanie włókien węglowych do tworzenia włóknistych, trójwymiarowych podłoży tkankowych mających zastosowanie między innymi w regeneracji ubytków kostnych [12]. Materiały tego typu naśladują naturalną strukturę i biologiczne funkcje substancji międzykomórkowej. Dlatego też posiadają przestrzenną, porowatą strukturę o rozmiarze porów optymalnym dla wzrostu, proliferacji czy adhezji określonego typu komórek.

Przedmiotem badań był kompozyt z osnową bioresorbowalnego polimeru, do której wprowadzono fazę modyfikującą w formie włókien węglowych. Oceniano jego stopień toksyczności w obecności ludzkich komórek kościotwórczych w warunkach *in vitro*.

## Material i metody

### Material

W pracy zastosowano kompozyt otrzymany z kopolimeru glikolidu z laktydem (18:82) wzmocnionego krótkimi włóknami węglowymi o długości 3 mm (PLGA+CF). Udział objętościowy włókien wynosił 15%. Kopolimer został zsyntetyzowany w obecności inicjatora o stosunkowo niskiej toksyczności – acetyloacetonianu cyrkonu [2]. Ocenę stopnia toksyczności wykonano na wysterylizowanych metodą plazmową próbkach w kształcie krążków o średnicy 16 mm, które rozmiarem były dostosowane do dołków płytek hodowlanych. Próbki pozyskano z Katedry Biomateriałów Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Eksperyment przeprowadzono wykorzystując ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19 zakupione w American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), numer katalogowy CRL-11372.

### Metody

Część doświadczalną niniejszej pracy przeprowadzono w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii i Immunologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrzu.

Hodowlę komórek prowadzono w plastikowych butelkach o pojemności 50ml (Nunc A/S Roskilde, Dania). Jako medium hodowlane stosowano podłoże Dulbecco's Modified Eagle's Medium oraz podłoże Ham's F12 połączone w proporcji 1:1 (bez czerwieni fenolowej i antybiotyków) z dodatkiem 2,5 mM L-glutaminy oraz 0,3 mg/ml G418 Sulphate i 10% płodowej surowicy cielęcej (FBS) inaktywowanej

posite, bioglass or hydroxyapatite they co-create [10,15]. Especially polymer/fibre composites are frequently seen in material engineering as an alternative to metallic implants. The presence of fibres in the polymer warp facilitates modifications of durability, elasticity and fragility of the material. It also creates the possibility to obtain implants characterised by biomimetic anisotropy with regard to the mechanical properties. Moreover, the modifying phase spread in the polymer matrix affects surface energy and the material's microstructure [16].

Biocompatible carbon fibres take a special place in the creation of composites. Their presence in polymers enables the obtaining of materials which are radiopotent and are characterised by a good balance between endurance and elasticity in relation to the density. A challenge for tissue engineering is the implementation of carbon fibres in creating fibrous, three-dimensional tissue media used among others in bone defect regeneration [12]. Materials of this type imitate the natural structure and biological functions of the intracellular substance. And so they have a spatial structure with pores the size of which is optimal for the growth, proliferation and adhesion of a particular type of cells.

The subject of the study was a composite with a bioresorbable polymer warp into which a modifying phase was introduced in the form of carbon fibres. The level of toxicity in the presence of human osteogenic cells was evaluated *in vitro*.

## Material and methods

### Material

For the purposes of this research a composite of polylactide-co-glycolide (18:82) reinforced with 3mm - short carbon fibres (PLGA+CF) was used. The fibres constituted 15% of the volume. The co-polymer was synthesized in the presence of an initiator of a relatively low toxicity – zirconium acetylacetonate [2]. The evaluation of the level of toxicity was carried out on disc-shaped plasma-sterilised samples of 16mm in diameter; their size matched the wells of the culture plates. The samples were obtained from the Department of Biomaterials of the AGH University of Science and Technology in Cracow.

The experiment was carried out with the use of the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line purchased from American Type Culture Collection – ATCC (Manassas, VA, USA), catalogue number CRL-11372.

### Methods

The experimental part of the work was conducted at the Faculty and Institute of Microbiology and Immunology of the Medical University of Silesia in Zabrze.

The cells were cultured in plastic 50 ml bottles (Nunc A/S Roskilde). Dulbecco's Modified Eagle's Medium was used together with Ham's F12 in proportion 1:1 (without phenol red and antibiotics) with the addition of 2,5 mM L-glutamine, 0,3mg/ml G418 Sulphate and 10% foetal bovine serum (FBS) inactivated thermally. The cells were cultured in a continuous manner at a temperature of 34°C, air containing 5% CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. The cells used in the research were after 6 passages, which guaranteed their stability and a constant rate of proliferation.

To evaluate of PLGA+CF cytotoxicity tests were performed on the copolymer's extract obtained through an 8-day incubation of samples of the studied biomaterial positioned at the bottom of the wells of a 24-well cell culture plate (Nunc A/S Roskilde) in 2 ml of medium identical to that used to culture the osteoblasts. The samples were incubated at a temperature of 37°C, air containing 5% CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. Next, 0,2ml of the obtained extract



termicznie. Komórki hodowano w sposób ciągły w temperaturze 34°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Komórki wykorzystane do badań były po 6 pasażu, co gwarantowało ich stabilność i stałe tempo proliferacji.

Do testów oceniających cytotoksyczność kopolimeru PLGA+CF wykorzystano jego ekstrakt uzyskany poprzez 8-dniową inkubację próbek badanego kompozytu umieszczonych na dnie dołków 24-dołkowej płytki do hodowli komórek (Nunc A/S Roskilde, Dania) w 2ml medium hodowlanego o składzie identycznym jak medium do hodowli osteoblastów. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Następnie objętość 0,2 ml uzyskanego w ten sposób ekstraktu oraz jego kolejnych rozcieńczeń w medium hodowlanym (rozcieńczenia w postępie geometrycznym od 1:2 do 1:128) dozowano do osteoblastów hFOB 1.19 zaadherowanych do dna dołków 96-dołkowej płytki do hodowli komórkowych (Nunc A/S Roskilde, Dania). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze powietrza z 5% zawartością CO<sub>2</sub> przy 100% wilgotności względnej. Czas inkubacji dla dwóch równolegle prowadzonych eksperymentów wynosił: 24 godziny oraz 48 godzin. Ocenę cytotoksycznego działania kopolimeru PLGA+CF na ludzkie osteoblasty dokonano poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT) [5,12] oraz dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) [6] wykonując każde z oznaczeń w trzech niezależnych powtórzeniach.

#### Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (test LDH)

Dehydrogenaza mleczanowa uwalniana jest z cytoplazmy do medium hodowlanego w wyniku uszkodzenia błony komórkowej i lizy komórek. Wzrost aktywności LDH w supernatantach hodowli komórkowych koreluje z odsetkiem martwych komórek. Wykorzystano test cytotoksyczności, którego zasada opiera się na dwóch reakcjach. Pierwsza z nich to redukcja NAD<sup>+</sup> do NADH/H<sup>+</sup> katalizowanej przez LDH konwersji mleczanu do pirogronianu. Kolejna reakcja to katalizowana przez diaforezę przeniesienie H/H<sup>+</sup> z NADH/H<sup>+</sup> na sól tetrazolową INT (chlorek 2-[2-jodofenyl]-3-[4-nitrofenyl]-5-fenylotetrazolowy), która jest redukowana do formazanu. Wzrost aktywności LDH jest proporcjonalny do stężenia formazanu. Rozpuszczalny w wodzie, barwiący się na czerwono formazan wykazuje maksimum absorpcji dla długości fali 490 nm, podczas gdy żółty roztwór soli tetrazolowej INT nie wykazuje absorpcji dla tej długości fali. Oznaczenie wykonano w 96 dołkowych płytkach według procedury podanej przez producenta [6]. Procent cytotoksyczności CT[%] obliczano posługując się następującym wzorem, do którego wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości A<sub>medium</sub> (absorbancja medium hodowlanego):

$$CT[\%]=\frac{(A_b-A_{ekstr})-A_{nk}}{(A_{wk}-A_{nk})}\times 100\%$$

gdzie:

A<sub>b</sub> – absorbancja próbki badanej,

A<sub>wk</sub> – absorbancja kontroli wysokiej, czyli wartość całkowitego uwolnienia LDH (maksymalne uwolnienie LDH po dodaniu do hodowli komórek 1% roztworu Tritonu X-100),

A<sub>nk</sub> – absorbancja kontroli niskiej, czyli wartość spontanicznego uwolnienia LDH (spontaniczne uwalnianie LDH podczas hodowli komórek natywnych),

A<sub>ekstr</sub> – absorbancja kontroli badanego ekstraktu.

#### Pomiar aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej (test MTT)

Wykorzystane do eksperymentu komórki po 24- lub 48-godzinnej inkubacji z badaną próbką ekstraktu PLGA+CF odplukiwano, a następnie dodawano do nich roztwór MTT uzyskując końcowe stężenie 1,1 mM. Hodowlę kontynuowa-

and its further dilutions in the growth medium (dilutions in geometric progression from 1:2 to 1:128) were added to the hFOB 1.19 osteoblasts adhered to the bottom of the wells of a 96-well cell culture plate (Nunc A/S Roskilde, Denmark). The plates were incubated at a temperature of 37°C, air containing 5%CO<sub>2</sub>, and 100% relative humidity. The incubation time of the two parallel experiments was: 24 hours and 48 hours. The evaluation of PLGA's cytotoxic effect on human osteoblasts was performed by measuring the activity of mitochondrial dehydrogenase (MTT assay) [5,12] and lactate dehydrogenase (LDH assay) [6]. Each assay was independently repeated thrice.

#### LDH (lactate dehydrogenase) release assay

Lactate dehydrogenase is released from the cytoplasm into the growth medium as a result of a damage to the cellular membrane and cellular lysis. Increased LDH activity in the supernatants of cell cultures correlates with the percentage of dead cells. The cytotoxicity test used in this research is based on two reactions. The first is the reduction of NAD<sup>+</sup> to NADH/H<sup>+</sup> catalyzed by LDH conversion of lactate to pyruvate. The other reaction is the transfer of H/H<sup>+</sup>, catalyzed by diaphoresis, from NADH/H<sup>+</sup> to tetrazolium salt INT (2-[2-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chloride), which is then reduced to formazane. The increase in LDH activity is proportionate to formazane concentration. Water soluble, staining red, formazane displays maximum absorption at wavelength 490nm, whilst the yellow solution of tetrazolium salt INT does not show absorption at this wavelength. The assay was performed in 96-well plates, following the procedure recommended by the manufacturer [6]. The cytotoxicity percentage CT[%] was calculated with the following formula (the values of particular absorbances had previously been diminished by subtracting A<sub>medium</sub> - absorbance of the growth medium):

$$CT[\%]=\frac{((A_s-A_{extr})-A_{lc})}{(A_{hc}-A_{lc})}\times 100\%$$

where:

A<sub>s</sub> – absorbance of the studied sample, A<sub>hc</sub> – absorbance of high control, i.e. the value of total LDH release (maximum LDH release after adding of 1% solution of Triton X-100 to the cell culture), A<sub>extr</sub> – absorbance of the control of the studied extract, A<sub>lc</sub> – absorbance of low control, i.e. the value of the spontaneous LDH release (spontaneous LDH release during native cell culturing).

#### MTT (mitochondrial dehydrogenase) activity assay

After 24- or 48-hour incubation with the studied PLGA+CF extract sample, the cells used in the experiment were rinsed and then the MTT solution was added, thereby obtaining the final concentration of 1,1mM. The culturing was continued for 4 hours in the same conditions as before. After that time the cells were centrifuged, the supernatant was decanted, and DMSO was added to the adhered cells with a view to extract MTT formazane from the cells. The supernatant was collected after 20 minutes and its absorbance was determined at a wavelength of 550nm implementing an automatic plate reader [5, 12]. The cytotoxicity percentage CT[%] was calculated with the following formula, where the values of particular absorbances had previously been diminished by subtracting A<sub>DMSO</sub>:

$$CT[\%]=100\%-(A_s\times 100\%)/A_c$$

where:

A<sub>s</sub> – absorbance of the studied sample,  
A<sub>c</sub> – absorbance of the control sample,  
A<sub>DMSO</sub> – DMSO absorbance.

no przez 4 godziny w identycznych warunkach jak poprzednio. Po tym czasie komórki odwirowywano, supernatant zlewano, a do zaadherowanych komórek dodawano DMSO w celu ekstrakcji formazanu MTT z komórek. Supernatant pobierano po 20 minutach i oznaczano jego absorbancję przy długości fali 550 nm stosując automatyczny czytnik płytek [5,12]. Procent cytotoksyczności CT[%] obliczano posługując się następującym wzorem, do którego wstawiano wartości poszczególnych absorbancji po uprzednim odjęciu wartości ADMSO:

$$CT[\%]=100\%-(A_b \times 100\%)/A_k$$

gdzie:

$A_b$  – absorbancja próbki badanej,  
 $A_k$  – absorbancja próbki kontrolnej,  
 ADMSO – absorbancja DMSO.

## Wyniki i dyskusja

Badania biologiczne wskazują, iż kopolimer PLGA+CF nie wykazuje toksycznego działania na ludzkie komórki kościotwórcze. Po 24 godzinach kontaktu osteoblastów z uzyskanym w obecności kompozytu ekstraktem stwierdzono nieznaczny procent cytotoksyczności zarówno w teście MTT (13%) jak i LDH (8,5%). Jednakże już po 48 godzinach eksperymentu cytotoksyczność w obu okresach ukształtowała się na poziomie zerowym. Mieszcząca się w granicach norm [11] jej wyższa wartość w pierwszym okresie mogła być efektem zachodzących jeszcze reakcji chemicznych, gwarantującym przeprowadzenie zastosowanych testów. Bilir i wsp. badający wpływ polilaktydowych membran na osteoblasty ludzkie również uzyskali podobne wyniki. Zastosowany przez nich test toksyczności (barwienie błękitem trypanu) wykazał nieznacznie mniejszą przeżywalność komórek po 24 godzinach ich kontaktu z materiałem aniżeli po 72 godzinach [3].

Przeprowadzone testy toksyczności wykazały, iż wprowadzone do osnowy polimerowej włókna węglowe nie wpłynęły w sposób negatywny na żywotność zastosowanych w badaniach komórek ludzkich. Podobne wnioski wysunęli autorzy pracy, którzy badali odpowiedź komórkową na wzmacnianą włóknami węglowymi matrycę z termopolimeru PTFE/PVDV/PP (politetrafluoroetylen/ poliwiniliden fluorku/ polipropylen). Oznaczona przez nich w teście MTT przeżywalność ludzkich osteoblastów hFOB 1.19 w kontakcie z badanym materiałem była wysoka, a nawet przewyższała poziom kontroli (czysty termopolimer). Udowodnili ponadto, iż spowodowana obecnością włókien węglowych porowatość kompozytu pozytywnie wpływa na żywotność komórek kościotwórczych [16]. Potwierdzają to badania, w których kontaktowano hodowlę komórek nabłonkowych ludzkiego raka płuc z włókninami węglowymi. Zastosowany przez autorów test toksyczności (barwienie błękitem trypanu) wykazał w obu okresach badawczych (24 i 72 godziny) mniejszą liczbę martwych komórek w kontakcie z włókniną porowatą niż jej postacią nieporowatą [12]. Dowodzi to, iż odpowiednia porowatość kompozytów w skali mikro sprzyja odżywianiu się komórek, a porowatość w skali nano wpływa pozytywnie na adhezję komórek do podłoża.

## Podsumowanie

Przeprowadzone in vitro badania biologiczne wykazały brak cytotoksycznego wpływu wzmocnionego włóknami węglowymi kopolimeru glikolidu z laktydem na ludzkie osteoblasty linii hFOB 1.19. Obecność fazy włóknistej w polimerowej osnowie nie wpłynęła w sposób negatywny na przeżywalność mających z nią kontakt komórek. Zastosowany w badaniach kompozyt wydaje się być interesującym rozwiązaniem dla celów kościozastępczych.

## Results and discussion

Biological examination demonstrates that PLGA+CF does not have a toxic effect on human osteogenic cells. After a 24-hour contact of osteoblasts with the extract obtained in the presence of the composite, a slight percentage of cytotoxicity was observed both in the MTT (13%) and the LDH (8,5%) tests. However, 48 hours into the experiment, cytotoxicity in both periods was null. The higher value in the first period, which was still within norm [11], may have been the effect of ongoing chemical reactions, guaranteeing the performing of the tests. Bilir et al. obtained similar results examining the effect of polylactide membranes on human osteoblasts. The toxicity test used in their experiment (trypan blue staining) showed a slightly lower cell survival rate after a 24-hour contact with the material than after 72 hours [3].

The performed toxicity tests showed that the carbon fibres introduced into the polymer warp did not have a negative effect on the survival rate of the human cells used in the study. Similar conclusions were drawn examining the cellular response on thermopolymer matrix PTFE/PVDV/PP (polytetrafluoroethylene/ polyvinyliden fluoride/polypropylene) reinforced with carbon fibres. The survival rate of the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line determined by the MTT test in contact with the studied material was high, and even higher than the control (pure thermopolymer). Furthermore, it was proven that the composite porosity caused by the presence of carbon fibres has a positive effect on the vitality of osteogenic cells [16]. This has been confirmed by research in which a culture of epithelial cells of human lung cancer was brought into contact with carbon fibres. The toxicity test used by the authors (trypan blue staining) showed in both study periods (24 and 72 hours) a smaller number of dead cells in contact with the porous fibre than with the non-porous fibre [12]. This shows that appropriate composite porosity on a microscale is conducive to cell nutrition, whilst on a nanoscale it affects positively cell adhesion to the base.

## Conclusions

The biological examination carried out in vitro showed the absence of a cytotoxic impact of PLGA+CF on the hFOB 1.19 human osteoblastic cell line. The cellular survival rate was not affected negatively by the presence of the fibrous phase in the polymer warp. The composite used in the study seems to constitute an interesting solution for bone substitution.

## Piśmiennictwo

- [1] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical application of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, 1996, 17, 93-102.
- [2] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grzeb P., Kryczka T., Ryba M., Walski M.: Kopolimery laktydu, glikolidu i ε-kaprolaktonu niezawierające metali ciężkich. Synteza własności i zastosowanie w procesie kontrolowanego uwalniania analogów nukleozydów. *Inżynieria Biomateriałów*, 2002, 23-25, 21-22.
- [3] Bilir A., Aybar B., Tanrikulu S.H., Issever H., Tuna S.: Biocompatibility of different barrier membranes in cultures of human CRL 11372 osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. *Clinical Oral Implants Research*, 2007, 18, 46-52.
- [4] Buczyńska J., Pamuła E., Błażewicz S., Bacakova L., Parizek M., Chlupac J., Mikołajczyk T., Boguń M., Dobrzyński P.: Włókniste podłoża dla inżynierii tkankowej kości: hodowle MG 63 w warunkach statycznych i dynamicznych. *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 65-66, 1-6.
- [5] Cell proliferation kit (MTT). Instruction manual. Version 3. Roche Applied Science, Germany, 2003.
- [6] Citotoxicity Detection Kit (LDH). Instruction manual. Roche Applied Science, Germany, Version July 2005.
- [7] Gerber-Leschyszyn B., Pawlak W., Dominiak M.: Możliwości rekonstrukcyjne pourazowych ubytków wyrostka zębodołowego szczęk z wykorzystaniem autogenego przeszczepu kostnego lub osteogenezy dystrykcyjnej - doniesienie wstępne. *Dental and Medical Problems*, 2005, 42, 1, 159 – 164.
- [8] Lewandowski L., Grodzki J.: Możliwości odtwarzania pourazowych i ponowotworowych ubytków kostnych dna oczodołu materiałami autogennymi lub alogenicznymi. *Otolaryngologia Polska*, 1996, 50(2), 135-138.
- [9] Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65, 55-63.

## References

- [10] Niedzielski K., Synder M., S. Mazurkiewicz i wsp.: Badania biomechaniczne nowej generacji ceramiki Sz2 jako materiałów kości-zastępczych stosowanych w wypełnieniu ubytków kostnych wytworzonych doświadczalnie. *Inżynieria Biomateriałów*, 2003, 28, 8-12.
- [11] PN-EN ISO 10993-5: Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoksyczności: metody in vitro, marzec 2001.
- [12] Rajzer I., Błażewicz M., Menaszek E., Czarny A., Zaczyńska E.: Wpływ średnicy włókien węglowych na odpowiedź komórkową. *Inżynieria Biomateriałów*, 2007, 67-68, 52-56.
- [13] Schakenraad J.M., Dijkstra P.J.: Biocompatibility of poly(DL-lactic acid/glycine) copolymers. *Clinical Material*, 1991, 7, 253-269.
- [14] Schwarz Z.: Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *Journal of Periodontal Research*, 2000, 71(8), 58-69.
- [15] Simon C.G., Khatri C.A., Wight A.A., Wang F.W.: Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002, 20, 473-482.
- [16] Stodolak E., Czajkowska B., Mikołajczyk T., Błażewicz M., Wołowska-Czapnik D.: Wpływ parametrów powierzchni kompozytowych materiałów włóknistych na odpowiedź komórkową. *Inżynieria Biomateriałów*, 2006, 54-55, 19-23.
- [17] Ślósarczyk A.: Bioceramika. *Ceramika Materiały Ogniotrwale*, 2000, 52(4), 127-130.
- [18] Waris E., Happonen H., Raatikainen T., Kaarela O., Tormala P., Santavirta S., Kontinen Y.T., Ashammakhi N.: Study of biomechanical properties of self-reinforced bioabsorbable implants for use in small bone fixation in the hand. *Inżynieria Biomateriałów*, 2004, 38-42, 15-18.

# WPŁYW FLUORYZACJI I PIASKOWANIA POWIERZCHNI SZKLIWA NA ADHEZJĘ ZAMKÓW ORTODONTYCZNYCH

KATARZYNA JANKOWSKA<sup>1</sup>, DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>2</sup>,  
MICHAŁ DWORAK<sup>3</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD ORTODONCJI, COLLEGIUM MEDICUM,  
UNIwersytet Jagielloński,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

<sup>2</sup> PRACOWNIA STOMATOLOGII DZIECIĘCEJ, COLLEGIUM MEDICUM,  
UNIwersytet Jagielloński,  
UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

<sup>3</sup> KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ  
I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

## Streszczenie

Celem badań było określenie zależności wytrzymałości złącza zamek ortodontyczny/szklivo od trzech sposobów przygotowania powierzchni zęba do przyklejania zamka oraz określenie ryzyka uszkodzenia szkliwa w przypadku oderwania zamka. Materiałem do badań było 27 nieuszkodzonych zębów przedtrzonowych, usuniętych ze wskazań ortodontycznych, które zostały losowo podzielone na 3 grupy i odpowiednio przygotowano poprzez: fluoryzację (grupa A), piaskowanie (grupa B) natomiast zęby z grupy C zostały użyte bez żadnych specjalnych zabiegów. Następnie metalowe zamki zostały przytwierdzone do policzkowych powierzchni zębów. Tak przygotowane próbki zostały zamoczone na okres dwóch tygodni w roztworze soli fizjologicznej o temperaturze 37°C a następnie poddane działaniu sił ścinających przy pomocy uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej. Potem powierzchnie zamków i szkliwa zębów były obserwowane za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Zauważono, że średnia wytrzymałość na zrywanie była najwyższa dla zębów oczyszczonych przy pomocy piaskowania (grupa B) a najniższa dla zębów poddanych fluoryzacji (grupa A). Znaczące różnice zauważono także na powierzchniach zamków i zębów: z grupy A prawie całe spoiwo pozostało na zamkach, podczas gdy dla grup B i C spoiwo pozostało zarówno na zamkach jak i na szkliwie. Nie zaobserwowano żadnych ubytków na powierzchni szkliwa. Wyniki badań wskazują, że piaskowanie powierzchni zęba jest sposobem gwarantującym przenoszenie największych obciążeń poprzez przyklejony zamek ortodontyczny.

**Słowa kluczowe:** wytrzymałość, szkliwo, zamki ortodontyczne

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 45-48]

## Wprowadzenie

Do produkcji metalowych zamków ortodontycznych wykorzystuje się zwykle stal nierdzewną (żelazo, chrom, nikiel). Można je wykonać poprzez stopniowe frezowanie stalowych sztabek lub stosując techniki odlewnicze. Zamek ortodontyczny składa się z podstawy, rowka, do którego wprowadzany jest łuk, oraz skrzydełek, o które zaczepiana jest ligatura wiążąca łuk z zamkiem. Rowek posiada

# EFFECTS OF ENAMEL FLUORIDATION AND AIR POLISHING ON ADHESION OF ORTHODONTIC BRACKETS

KATARZYNA JANKOWSKA<sup>1</sup>, DOROTA KOŚCIELNIAK<sup>2</sup>,  
MICHAŁ DWORAK<sup>3</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CHAIR OF ORTHODONTICS, COLLEGE OF MEDICINE,  
JAGIELLONIAN UNIVERSITY,  
4 MONTELUPICH STR., 31-155 CRACOW, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF PEDODONTICS, COLLEGE OF MEDICINE,  
JAGIELLONIAN UNIVERSITY,  
4 MONTELUPICH STR., 31-155 CRACOW, POLAND

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE  
AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

## Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of three surface preparations of human enamel on shear bond strength of orthodontic brackets bonded to enamel, and to determine the risk of enamel damage after debonding. In the experiment, 27 human premolars extracted for orthodontic reason, were divided into 3 groups and submitted to: fluoridation (group A), air polishing (group B), while group C was used without any special treatment. Afterwards metal brackets were bonded to the labial surfaces of the teeth. After soaking of the samples in physiological saline for 2 weeks at 37°C the brackets were debonded with the use of a universal testing machine to measure shear bond strength. After debonding the enamel and brackets surfaces were observed under stereomicroscope. It was found that the mean bond strength of the brackets was the highest for the teeth which enamel was air-polished (group B), while the lowest for the teeth submitted to fluoridation (group A). There were significant differences in the morphology of the adhesive remaining on the enamel and the bracket: for group A almost the whole adhesive remained on the brackets, while for group B and C adhesive was observed on both brackets and enamel. No enamel damage caused by debonding was observed. The results show that air-polishing is the best method to prepare the surface of the enamel to achieve the highest retention of the orthodontic brackets.

**Keywords:** adhesion, orthodontic brackets, enamel

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 45-48]

## Introduction

Orthodontic brackets are usually made of stainless steel (iron, chrome, nickel) through gradual milling or founding techniques. The orthodontic bracket consists of a ground plate, a groove to fix the arch, and wings to which the ligature binding the arc with the brackets is attached. The groove is quadrangular in shape. On the surface of the bracket retention grooves enlarging surface area are present. Orthodontic bracket transfers loads able to delocalise teeth in the dental arch. As a result inappropriate placing of the bracket on the enamel surface may cause undesirable tramps of the teeth. Also the loads applied to the bracket

kształt czworokątny, a na powierzchni zamka usytuowane są zachyłki zwiększające retencję. Zamek jest elementem, poprzez który przenoszone są siły zmieniające położenie zęba w łuku zębowym. Z tego też powodu, nieprawidłowe jego umieszczenie na powierzchni szkliwa powoduje niepożądane wędrowki zębów. Równie istotne jest przyłożenie do zamka siły o odpowiedniej wartości tak, aby uzyskać przemieszczenie zęba nie doprowadzając do nieodwracalnych zmian w obrębie zęba lub w tkankach przyzębia [1].

Na siłę wiązania zamka ortodontycznego do powierzchni zęba wpływa zawartość wypełniacza w spoiwie - duża jego zawartość zapewnia lepsze przyleganie do zamków z mechaniczną retencją [2]. Istotna jest również grubość materiału pomiędzy podstawą zamka a powierzchnią zęba, jak również odpowiednio przygotowane szkliwo zęba [2]. W literaturze analizowane były różne metody modyfikacji powierzchni szkliwa, aby poprawić jego siłę wiązania ze spoiwem łączącym go z zamkiem ortodontycznym [3]. Ponadto, znane są doniesienia, że takie zabiegi jak wybielanie [4] i fluoryzacja [5] mogą mieć wpływ na siłę wiązania zamków ortodontycznych ze szkliwem.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania miały na celu określenie zależności pomiędzy sposobem przygotowania powierzchni zębów a adhezją zamków ortodontycznych mocowanych przy użyciu światłoutwardzalnego materiału kompozytowego.

## Materiały i metody

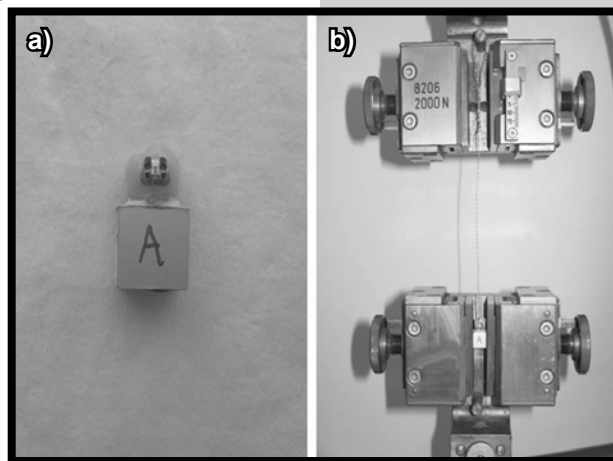
Badania laboratoryjne *in vitro* przeprowadzono na 27 nieuszkodzonych zębach przedtrzonowych, usuniętych ze wskazań ortodontycznych. Do czasu rozpoczęcia badania, zęby przetrzymywano w 1% wodnym roztworze chloraminy T. Następnie oczyszczano je szczoteczką i pastą Clean Polish (Kerr Hawe). Zęby zatopiono w żywicy akrylowej, którą wprowadzono w formy aluminiowe o przekroju kwadratowym, w taki sposób, aby wyeksponować ich powierzchnie wargowe i zapewnić powtarzalne warunki eksperymentu (RYS. 1a). Badane zęby zostały losowo przydzielone do trzech grup (po 9 próbek): A-zęby poddawane fluoryzacji; B-zęby piaskowane i zęby C-stanowiące kontrolę, zostały użyte bez żadnych specjalnych zabiegów. Fluoryzację wykonywano dwa tygodnie przed zabiegiem przyklejenia zamków za pomocą preparatu Fluor Protector (Vivadent). Po pięciu minutach od nałożenia preparatu fluoryzacyjnego zęby umieszczono w płynie fizjologicznym w 37°C na 14 dni. Po tym czasie zęby wypłukano i wysuszono. Zęby z grupy B wypięskowano za pomocą piaskarki Prophyflex (KaVo), przepłukano wodą i wysuszono. Następnie powierzchnię szkliwa wszystkich zębów wytrawiono za pomocą kwasu ortofosforowego przez 30s, wypłukano wodą i wysuszono. Później zgodnie z zaleceniami producenta zastosowano materiał podkładowy (Transbond XT Light Cure Adhesive Primer, 3M Unitek) i materiał światłoutwardzalny (Transbond XT Light Cure Adhesive Paste, 3M Unitek).

should be optimal in order to obtain dislocation of the tooth but not to exert irreversible changes of the tooth tissue and periodontium [1]. The adhesion of orthodontic bracket which mechanical retainers to the surface of enamel depends on the content of filler in the resin, e.g. higher content of the filler – better adhesion is observed [2]. The thickness of the material between the surface of the brackets and the tooth as well appropriate preparation of the enamel are also essential factors. In the literature many methods of enamel surface modification were evaluated in order to improve the adhesion of orthodontic bracket with bond and enamel [3]. Moreover, it was reported that bleaching [4] and fluoridation [5] may influence bond strength of orthodontic brackets with enamel.

The aim of this study was to find relationship between methods of enamel preparation and adhesion of light-hardened composite bond to the enamel and orthodontic brackets.

## Materials and methods

In this study 27 non-carious premolars, extracted for orthodontic reason, were collected and stored in 1% Chloramine T solution at room temperature until use. The teeth were cleansed with a brush and a paste Clean Polish (Kerr Hawe). Each tooth was mounted in self-curing acrylic resin poured into home-made aluminium mould to expose the labial surface and to allow for standardized and secure place during testing (FIG. 1a). Teeth were randomly assigned to three groups of 9 specimens each: A-teeth submitted to fluoridation; B-teeth air-polished; and C-teeth without additional treatment, except cleansing. The teeth from group A were submitted to fluoridation by application of fluoride varnish (Fluor Protector, Vivadent). Five minutes after fluoride application, the teeth were placed in physiological saline for 14 days at 37°C. Then, the teeth were rinsed with water and dried. The teeth from group B were air polished with the use of Prophyflex, KaVo, rinsed with water and dried.



**RYS. 1. Sposób zamontowania zęba z zamkiem ortodontycznym w żywicy akrylowej (a) i w uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 (b). FIG. 1. Method of mounting in acrylic resin of the tooth with the orthodontic bracket (a) and in universal testing machine Zwick 1435 to evaluate shear bond strength (b).**

Enamel surfaces of all experimental groups were etched with phosphoric acid for 30s, rinsed with water and dried. Transbond XT Light Cure Adhesive Primer and Transbond XT Light Cure Adhesive Paste (3M Unitek) were applied as suggested by the manufacturer. The bracket was placed on the tooth and pressed firmly onto the surface, and the adhesive was cured by a halogen light source for 20s. The brackets were placed according to the following rules: the groove was placed at right angles to the long axis of the tooth; the orthodontic bracket was placed in the middle the atrial surface; the orthodontic bracket was situated in the suitable distance from chewing surface. During the procedure orthodontic nippers and position indicator, enabling positioning of the brackets on the constant and required height were used.

In the experiment premolars stainless steel brackets (Slot: 0.56x0.76mm, Torque -7°, Angulation: 0°, Ultra-Min-itrim®, Dentadurum, Germany) were used. The average surface area of the bracket base was 9.5mm<sup>2</sup>.

Zamek umieszczano na zębie, przyciskano do powierzchni szkliva a następnie naświetlano lampą halogenową przez 20s. Umieszczając zamek na powierzchni wargowej zęba kierowano się następującymi zasadami: i) rowek umieszczano pod kątem prostym do osi długiej zęba; ii) zamek znajdował się pośrodku powierzchni przedstonkowej; iii) zamek usytuowany był w odpowiedniej odległości od powierzchni żującej. W trakcie przeprowadzania zabiegu używano pęsety do zamków ortodontycznych oraz pozycjonera ułatwiającego umieszczenie zamka na stałej, odpowiedniej wysokości.

Do badań użyto zamki metalowe przeznaczone do zębów przedtrzonowych (rowek: 0,56x0,76mm, skręt -7°, kąt: 0°, Ultra-Minitrim®, Dentadurum, Niemcy). Powierzchnia podstawy zamka wynosiła 9.5mm<sup>2</sup>.

Badania wytrzymałość złącza zamek/ząb wykonano za pomocą uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej (Zwick 1435, Niemcy) przy prędkości obciążania 2mm/min. Formy aluminiowe z zatopionymi w żywicy zamkami zamontowano w szczękach maszyny wytrzymałościowej. Wykonano pętlę z drutu ligaturowego (średnica 0,4mm, Dentadurum, Niemcy), który przymocowano do zamka, zaś drugi jego koniec zamocowano w uchwytach maszyny wytrzymałościowej (FIG. 1b). Wyznaczano siłę konieczną do oderwania zamka od szkliwa [N], którą następnie przeliczano na wytrzymałość dzieląc ją przez pole powierzchni zamka [MPa]. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią i przedział ufności ( $\alpha=0.95$ ) i analizowano za pomocą testu t-Studenta.

Po badaniach wytrzymałościowych zamki i zęby obserwowano za pomocą mikroskopu stereoskopowego przy powiększeniu 15x (StereoDiscovery V.8, Zeiss, Niemcy), wyposażonego w aparat cyfrowy (Canon PS A620).

## Wyniki i dyskusja

Wyniki badań wytrzymałości złącza zamek ortodontyczny/ząb w funkcji sposobu przygotowania szkliwa zębów przedstawiono w TABELI 1. Analiza statystyczna (w oparciu o t-test) wykazała istotne różnice w wartości wytrzymałości złącza zamek/szkliwo pomiędzy badanymi grupami.

Reprezentatywne obrazy z mikroskopu stereoskopowego przedstawiono na RYS. 2. W przypadku zębów poddanych fluoryzacji, całe spoiwo pozostało na powierzchni zamka,

co dowodzi, że siły wiążące spoiwo z zębem były niewielkie (RYS. 2a). W przypadku zębów poddanych piaskowaniu (grupa B), część spoiwa pozostała na powierzchni zamka a część na powierzchni zęba (RYS. 2b). Dla zębów bez obróbki, znacznie więcej spoiwa pozostało na szkliwie niż na zamkach, a w kilku przypadkach całe spoiwo pozostało na powierzchni zęba (RYS. 2c). Na żadnym z zębów nie zaobserwowano uszkodzeń szkliwa.

Wyniki badań niniejszej pracy wykazały, że wytrzymałość połączeń dla zamków ortodontycznych, jest znacząco niższa niż przedstawiona w piśmiennictwie [6-8].

Bond strength testing was performed using a universal testing machine (Zwick 1435, Germany) at a cross-head speed of 2mm/min. The aluminium moulds with the embedded teeth and the brackets were mounted in the apparatus. Stainless steel ligature wire (diameter 0.4mm, Dentadurum, Germany) was looped around the bracket and then attached to the clamp on the Zwick machine (FIG. 1b). The maximum stress necessary to debond was recorded in [N] and the bond strength was calculated by dividing the debond force by the bracket area yielding [MPa], as a unit. The results were presented as average and confidence interval ( $\alpha=0.95$ ), and analysed by Student t-test to compare the differences between the experimental groups.

After bond strength testing, the brackets and the enamel surfaces were examined under a stereomicroscope (StereoDiscovery V.8, Zeiss) with a digital camera (Canon PS A620) at 15x magnification to determine the bond failure interface.

## Results and discussion

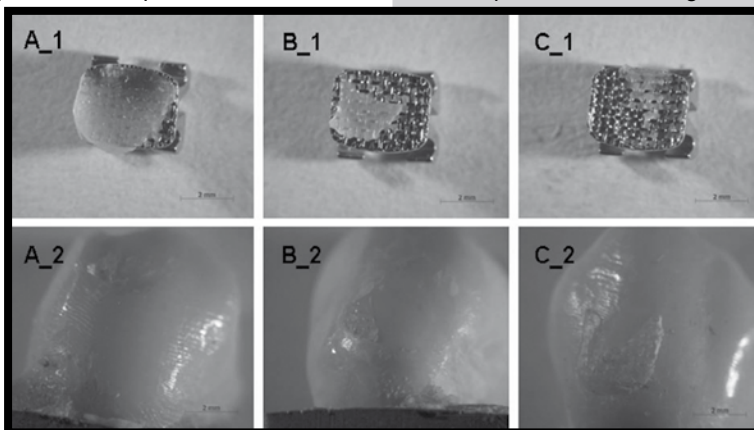
The results of bond strength of the orthodontic brackets as a function of the enamel treatment procedure are presented in TABLE 1. The statistical analysis (a paired t-test) indicated that there were significant differences in shear bond strength between all groups.

**TABELA 1. Wytrzymałość złącza zamek ortodontyczny/szkliwo.**

**TABLE 1. Bond strength of orthodontic brackets.**

Próbka Sample	Obróbka szkliwa Enamel treatment	Wytrzymałość złącza zamek/szkliwo Bond strength bracket/enamel [MPa]
A	Fluoryzacja Fluoridation	1.26 (0.72)
B	Piaskowanie Air-polishing	3.59 (1.1)
C	Bez obróbki Without treat- ment	2.69 (0.95)

Representative images from stereomicroscope are



**RYS. 2. Obrazy z mikroskopu stereoskopowego powierzchni zamków (A\_1, B\_1, C\_1) i zębów (A\_2, B\_2, C\_2) po badaniach wytrzymałościowych w zależności od sposobu modyfikacji powierzchni szkliwa: A – po fluoryzacji, B – po piaskowaniu, C – kontrola; powiększenie 15x.**

**FIG. 2. Stereomicroscope images of brackets (A\_1, B\_1, C\_1) and teeth (A\_2, B\_2, C\_2) after mechanical tests as a function of enamel modification: A- after fluoridation, B – after air-polishing, C – control; magnification 15x.**

presented in FIG. 2. It is shown that in the case of the teeth submitted to fluoridation the whole adhesive remained on the bracket, what proves that the adhesion between the enamel and the adhesive was weak (FIG. 2a). For teeth submitted to air-polishing (group B) about half of the enamel bonding site was covered with adhesive (FIG. 2b). For teeth without any special modification (control group C) much more adhesive was observed on the enamel than on the brackets, and in some teeth enamel bonding site was covered entirely with adhesive (FIG. 2c). No enamel damage caused by debonding was observed in any of the experimental groups.

Uważa się, że wytrzymałość połączeń, niezbędna w leczeniu ortodontycznym powinna mieścić się w przedziale od 5,9 do 7,8 MPa [9]. Średnia wartość wytrzymałości uzyskana w niniejszych badaniach wynosiła pomiędzy 1,2 i 3,6 MPa. Powodem obniżonej wytrzymałości może być to, iż przed badaniem materiał został na okres dwóch tygodni umieszczony w roztworze soli fizjologicznej. Prawdopodobnie środowisko to było zbyt inwazyjne i doprowadziło do zmniejszenia wytrzymałości. Dla porównania, w innych badaniach, w celu zasymulowania środowiska panującego w jamie ustnej, autorzy przed badaniem umieszczali próbki na krótki czas ( $\leq 24$  godzin) w wilgotnym pojemniku [10], w wodzie destylowanej [11] lub też w chloraminie [12]. W kilku pracach, badania wytrzymałościowe były przeprowadzane natychmiast po przyklejeniu zamków [7-8]. Z tego też powodu, interesujące będzie w przyszłości określenie wpływu czasu przechowywania próbek w roztworze soli fizjologicznej na wartość wytrzymałości łączącej zamek z zębem.

Wyniki badań wskazują, że piaskowanie zwiększa wartość wytrzymałości, podczas gdy zabiegi fluoryzacyjne powodują obniżenie tego parametru. Wyniki naszych badań, w odniesieniu do zabiegów fluoryzacyjnych wydają się być zaskakujące i pozostają w sprzeczności z wcześniejszymi badaniami Kimury i wsp. [5], którzy wykazali znikomą lub nawet całkowity brak wpływu tych zabiegów na wytrzymałość połączenia zęb/zamek ortodontyczny. Jakkolwiek należy zwrócić uwagę, że w pracy [5] zęby po zastosowaniu zabiegów fluoryzacyjnych zostały umieszczone w ludzkiej ślinie. Następnie, zęby zostały dokładnie oczyszczone mączką pumekową, spłukane wodą i osuszone a po czym zamki przyklejono zgodnie ze standardową procedurą. W naszych badaniach, po zabiegu fluoryzacji zęby zostały umieszczone soli fizjologicznej, a przed przyklejeniem zamka nie zostały specjalnie oczyszczone. Prawdopodobnym jest, że resztki preparatu fluoryzacyjnego uniemożliwiły właściwą adhezję pomiędzy zamkiem z powierzchnią zęba, co zostało zaobserwowane pod mikroskopem stereoskopowym (RYS. 2a). Z tego też powodu, interesujące wydaje się sprawdzenie, czy profesjonalne oczyszczenie zębów po zabiegu fluoryzacyjnym wpływa na zwiększenie siły adhezji zamka do szkliwa.

## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można wysnuć wniosek, że zamki ortodontyczne przymocowane za pomocą materiału światłoutwardzalnego do powierzchni zębów po piaskowaniu wykazują zdolność przenoszenia największych obciążeń. Fluoryzacja zębów wpływa natomiast na obniżenie siły wiązania materiału światłoutwardzalnego z powierzchnią szkliwa.

## Piśmiennictwo

- [1] Zarys współczesnej ortodoncji. Podręcznik dla studentów i lekarzy stomatologii. Pod redakcją I. Karłowskiej, PZWL, Warszawa, 2001; 238-43.
- [2] Ortopedia szczękowa zasady i praktyka. Podręcznik dla studentów stomatologii. Pod red. F. Fabiszewskiej-Jaruzelskiej, PZWL, Warszawa, 1995; 292-5.
- [3] Proffit W.R., Fields H.W.Jr .Ortodoncja współczesna. Wyd. Czelej, Lublin, 2001; 306-10, 416-9.
- [4] Uysal T., Basciftci F.A., Usomez S., Sari Z., Buyukermen A. Can previously bleached teeth be bonded safely? Am J Orthod Dentofacial Orthop 2003;123:628-32.
- [5] Kimura T., Dunn W.J., Taloumis L.J. Effects of fluoride varnish on the in vitro bond strength of orthodontic brackets using a self-etching primer system. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:351-6.
- [6] Yi G.K., Dunn W.J., Taloumis L.J. Shear bond strength comparison between direct and indirect bonded orthodontic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2003;124:577-81

The results of shear bond strength of orthodontic brackets bonded to human enamel presented in this study are significantly lower than those reported by others [6-8]. It is believed that shear bond strengths in the range of 5.9 to 7.8 MPa are needed to sustain normal oral and orthodontic forces [9]. The mean bond strengths in this study were in the range between of 1.2 and 3.6 Pa. The reason for low bonding strengths may be that the samples were incubated in physiological saline for two weeks after bonding of the brackets, before the mechanical tests were performed. Probably the conditions of incubation were too severe, and they caused decrease in bonding strength. For example, in the other experiments to simulate the humid environment of the oral cavity the authors stored the samples up to 24h in moist plastic container [10] or in distilled water [11] or in chloramine [12] before testing bond strength. In some experiments the bond strength was tested immediately after bracket bonding [7-8]. Therefore in our future experiments it would be interesting to study the influence of incubation time in physiological saline on bond strength of the orthodontic brackets.

The results show that air-polishing increases bond strength, while fluoridation decreases this parameter. Our results regarding fluoridation are somehow surprising, and in contradiction with a recent study of Kimura et al [5] who showed that administration of fluoride varnish has little or no effect on enamel bond strength. However, it must be admitted that in the latter study after fluoride application, the specimens were placed in whole human saliva. Afterwards, the teeth were removed from the saliva and cleaned with fine flour of pumice, rinsed with water, dried, and the brackets were glued according to a standard procedure. In our experiments, the teeth were stored in physiological saline, but before gluing the brackets the teeth were not specially cleaned. It is probable that remnants of the fluoride varnish prevent proper adhesion of the adhesive onto to enamel, what was observed by stereomicroscope (see FIG. 2a). In our future studies it would be interesting to check if professional cleaning of the teeth after fluoridation would improve retention of orthodontic brackets.

## Conclusion

The results of this study show that air polishing is the best method to prepare the surface of the enamel to achieve the highest shear bond strength of the orthodontic brackets. On the other hand the teeth after fluoridation present the lowest retention of the orthodontic brackets.

## References

- [7] Wang W.N., Li C.H., Chou T.H., Wang D.D.H., Lin L.H., Lin C.T. Bond strength of various base designs. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125:65-70
- [8] Klocke A., Kahl-Nieke B. Influence of force location in orthodontic shear bond strength testing. Dental Mat 2005;21:391-6.
- [9] Reynolds I. A review of direct orthodontic bonding. Br J Orthod 1975;2:71-8.
- [10] Reddy L., Marker V.A., Eblis E. Bond strength for orthodontic brackets contaminated by blond: composite versus resin-modified glass monomer cements. J Oral Maxillofac Surg 2003;61:206-13.
- [11] Yamamoto A., Yoshida T., Tsubota K., Takamizawa T., Kurosawa H., Miyazaki M. Orthodontic bracket: Enamel Bond strength vs time. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2006;130:435.3.e1-435.e6
- [12] Evans L.J., Peters C., Flickinger C., Taloumis L., Dunn W. A comparison of shear bond strengths of orthodontic brackets using various light sources, light guides, and cure time. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2002;121:510-5., 2004, 38-42, 15-18.

# OTRZYMYWANIE POROWATEGO TYTANU NA IMPLANTY MEDYCZNE

BARBARA SZARANIEC<sup>1</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>1</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>1</sup>, SOPHIA PAPARGYRI<sup>2</sup>, DIMITRIS TSIPAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AGH, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,

AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>2</sup>UNIWERSYTET ARYSTOTELESA, SZKOŁA INŻYNIERII MECHANICZNEJ, 541 24 SALONIKI, GRECJA

## Streszczenie

*Celem pracy było otrzymanie metodą metalurgii proszków porowatych kształtek tytanowych przeznaczonych na implanty medyczne. Przeprowadzono próbę zoptymalizowania procesu technologicznego. Poprzez dobór odpowiednich parametrów takich jak środowisko, temperatura obróbki termicznej, a także ilość użytego porogenu uzyskano próbki tytanowe o zróżnicowanej porowatości i właściwościach mechanicznych. W pracy przedstawiono dwie metody otrzymywania omawianych próbek, z których pierwsza (obróbka termiczna w atmosferze argonu) okazała się nieskuteczna, ze względu na destrukcję materiału, natomiast druga metoda (obróbka termiczna z zastosowaniem próżni) pozwoliła otrzymać próbki o założonych parametrach.*

**Słowa kluczowe:** porowaty tytan, metalurgia proszków

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 49-52]

## Wprowadzenie

Od implantów stosowanych w chirurgii kostnej oczekuje się, aby ich fiksacja z kością następowała stosunkowo szybko i w efekcie powstawało silne wiązanie na granicy faz. Duże znaczenie w procesie łączenia implantu z kością ma jego mikrostruktura (zwłaszcza w warstwie przypowierzchniowej). Istotne jest, aby była ona zbliżona do tej jaką posiada tkanka kostna [1-2]. Decydujący wpływ na możliwość tworzenia się złącza biologicznego (poprzez wrastanie tkanki kostnej w pory implantu) ma porowatość materiału, a szczególnie wielkość i rozkład porów. Aby proces osteointegracji zachodził efektywnie niezbędna jest obecność porów w zakresie zazwyczaj 50-600  $\mu\text{m}$ , które pozwalają na wrastanie komórek i transport płynów ustrojowych [3-4]. Jeżeli dodatkowo implant ma pełnić funkcję biomechaniczną musi posiadać również wysoką wytrzymałość i odpowiedni moduł Younga. Porowaty tytan może sprostać powyższym wymaganiom. Jego wysoka wytrzymałość, niski moduł Younga, mała gęstość oraz wielokrotnie potwierdzona biogodność [5-6] sprawiają, że prowadzonych jest wiele prac badawczych mających na celu opracowanie nowych implantów tytanowych o optymalnej mikrostrukturze oraz parametrach mechanicznych i biologicznych.

## Materiały, metody i dyskusja

Przygotowano zestaw próbek tytanowych w kształcie walca o wymiarach (wysokość 10mm i średnica 10mm). Walce tytanowe otrzymywano metodą metalurgii proszków. W tym celu proszek tytanowy (Texas Ltd, USA) mieszano z poroginem (wodorowęglan amonu) a następnie sprasowywano

# OBTAINING OF POROUS TITANIUM FOR MEDICAL IMPLANTS

BARBARA SZARANIEC<sup>1</sup>, MAGDALENA ZIĄBKA<sup>1</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>1</sup>, SOPHIA PAPARGYRI<sup>2</sup>, DIMITRIS TSIPAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>AGH-UST, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,

30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>2</sup>ARISTOTLE UNIVERSITY, SCHOOL OF MECHANIC ENGINEERING, 541 24 THESSALONIKI, GREECE

## Abstract

*The aim of this work was to obtain porous titanium sponges in a powder metallurgy process which might be applied as medical implants. The attempt of process optimization was carried out. Selection of parameters such as biological solution, temperature of thermal treatment and porogen amount allowed to obtain titanium samples with different porosity and proper mechanical properties. Two types of obtaining methods were presented in this work. First (thermal treatment in argon atmosphere) which was not sufficient due to material destruction and second (thermal treatment in vacuum atmosphere) which allows to obtain titanium samples with expected parameters.*

**Keywords:** porous titanium, powder metallurgy

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 49-52]

## Introduction

Implants application for a bone surgery should cause an appearance of fixation with bone which should be not only strong but also should occur quite fast. For this process the implant microstructure especially in a superficial layer is very important. Similarly it is in the case of the microstructure of bone tissue [1-2].

Porosity of the material has decisive influence on formation of biological joint (through bone overgrowing into implant's pores); particularly size and distribution of pores exert influence on it. In order to that, appearance of pores usually in range between 50 and 600  $\mu\text{m}$  is one of the most important conditions for an effective osteointegration due to the ingrowth of cells and the transportation of the body fluids [3-4]. Additionally, if the implant fulfills biomechanic function, it has to have high strength and proper Young modulus. That is why (for these requirements) porous titanium might be the right material. Due to its high strength, low Young modulus, low density and proved biocompatibility [5-6] titanium remains in the area of interests. There are a lot of researches concerning the new titanium implants focused on an optimum microstructure, mechanical and biological parameters.

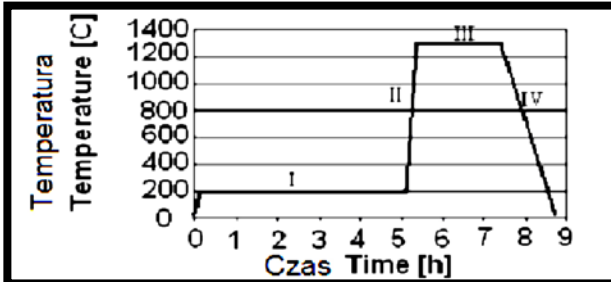
## Materials, methods and discussion

Set of titanium samples (cylindrical shape, height 10mm and diameter 10mm) was prepared. Titanium cylinders were obtained as a result of using powder metallurgy method. That is why titanium powder (Texas Ltd, USA) was mixed with porogens (ammonium carbonate) and isostatically pressed. Porogene's percentage contents (mass fraction) were as follows: 5, 10, 20 and 30%. Samples were put in the furnace and thermally treated in the following stages (FIG. 1).



izostaticznie. Udziały wagowe porogenu w wypraskach wynosiły odpowiednio 5, 10, 20 i 30%. Następnie wypraski umieszczano w piecu i poddawano obróbce termicznej (RYS. 1), w następujących etapach:

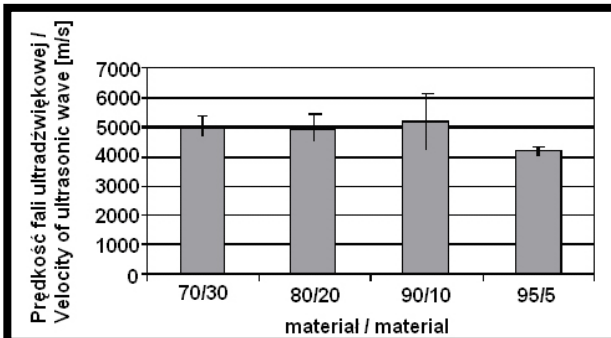
- I. Wygrzewanie próbek w temp. 200°C (5h, argon)
- II. Ogrzewanie próbek do temp. 1250°C (argon)
- III. Spiekanie próbek w temp. 1250°C (2h, argon)
- IV. Chłodzenie z piecem (argon)



RYS. 1. Schemat otrzymywania porowatego tytanu - metoda 1.

FIG. 1. Porous titanium obtaining scheme - method 1.

Aby zapobiec tworzeniu się związków tytanu (m.in. tlenków, azotków) obróbka termiczna w całości odbywała się przy stałym przepływie argonu. Mimo tego próbki otrzymane po obróbce termicznej były zniekształcone i bardzo kruche. Przeprowadzona analiza XRD wykazała oprócz niewielkiej ilości tytanu liczne azotki i tlenki (RYS. 2). Niezależnie od ilości wprowadzonego porogenu próbki nie różniły się znacząco między sobą, o czym mogą świadczyć bardzo zbliżone wartości prędkości fali ultradźwiękowej (RYS. 3).



RYS. 3. Prędkość fali ultradźwiękowej w badanych próbkach.

FIG. 3. Velocity of ultrasonic wave of investigated samples.

Ponieważ nie udało się otrzymać kształtek tytanowych o zróżnicowanej porowatości zmieniono parametry procesu technologicznego i podzielono go na dwa niezależne etapy. Pierwszy etap obejmował wstępną obróbkę termiczną wypraski w celu usunięcia porogenu. Drugi etap obejmował spiekanie w wysokiej próżni ( $5 \cdot 10^{-4}$  mbar). Porogen usuwano w temperaturze 200°C na dwa sposoby:

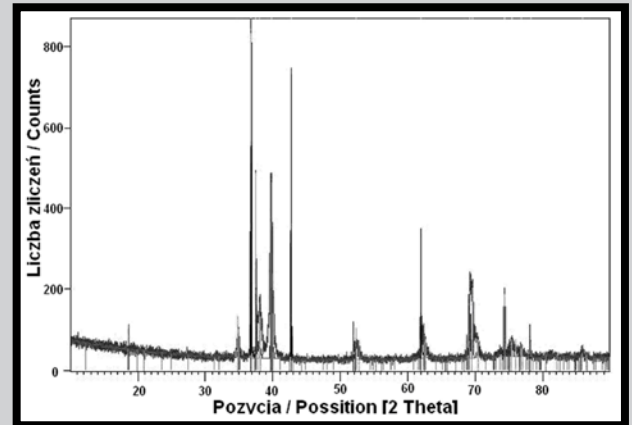
- 1) przy stałym przepływie argonu (dla tytanu z 20% zawartością porogenu - próbka „80/20A”),
- 2) w niskiej próżni - ok. 6mbar (dla tytanu z 30% zawartością porogenu - próbka „70/30V”).

Zmodyfikowany sposób otrzymywania porowatego tytanu przedstawiono schematycznie (RYS. 4):

- I. Wygrzewanie w temp. 200°C, (5h argon lub niska próżnia ok. 6mbar)
- II. Chłodzenie do temp. pokojowej
- III. Ogrzewanie próbek do temp. 1250°C (10°C/min, próżnia)
- IV. Spiekanie próbek w temp. 1250°C, (2h, wysoka próżnia <math>5 \cdot 10^{-4}</math>mbar)

Stage I - soaking (200°C, 5h, argon atmosphere),  
Stage II - thermal heating (up to 1250°C, argon atmosphere),  
Stage III - sintering (1250°C, 2h, argon atmosphere),  
Stage IV - self cooling (argon atmosphere).

During thermal treatment argon atmosphere (constant flow) was used to prevent titanium from compound forming (oxygens, nitrogens). In spite of the thermal treatment, all of the samples were brittle and distorted. XRD analysis showed that apart from small amounts of pure titanium its oxygens and nitrogens were present (FIG. 2). Different amounts of porogen introduced to basic titanium powder did not change samples' structure significantly what was proved by the ultrasonic wave velocity test (similar values for different samples were obtained) (FIG. 3).



RYS. 2. Dyfraktogram XRD dla próbki tytanowej (metoda 1).

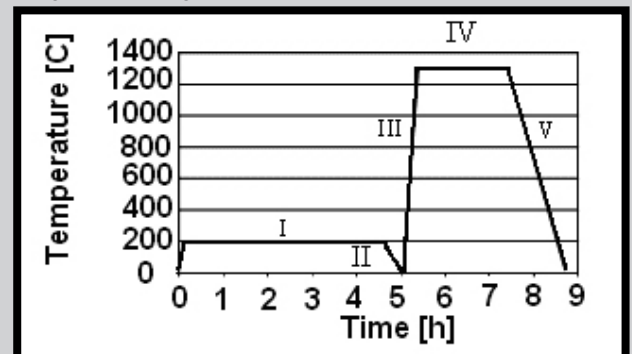
FIG. 2. XRD diffractogram of titanium sample (method 1).

Due to the fact that with such approach it was impossible to obtain titanium samples with different porosity, thermal treatment was divided in two parts. Technological parameters of this method were also changed. First stage includes pre-thermal treatment of the specimens in purpose of porogens removal. Second stage includes sintering under high vacuum ( $5 \cdot 10^{-4}$ mbar). Porogen was removed at the temperature of 200°C in two ways:

- 1) under constant argon flow (titanium with 20% oxygens, nitrogens - 80/20A),
- 2) under low vacuum about 6 mbar (titanium with 30% oxygens, nitrogens - 70/30V).

Modified way of porous titanium obtaining was schematically presented (FIG. 4):

- Stage I - soaking (200°C, 5h, argon atmosphere or low vacuum - 6 mbar),
- Stage II - cooling (up to a room temperature),

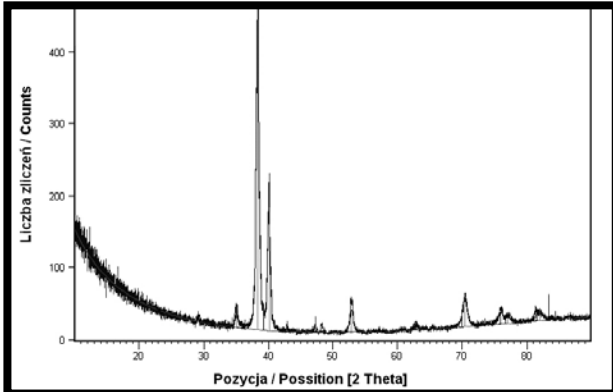


RYS. 4. Schemat otrzymywania porowatego tytanu - metoda 2.

FIG. 4. Porous titanium obtaining scheme - method 2.

V. Chłodzenie z piecem (1200 - 700°C  $<5 \cdot 10^{-4}$  mbar, 700 - 20°C  $<1 \cdot 10^{-2}$  mbar).

Oba sposoby usuwania porogenu okazały się skuteczne. Spieczone kształtki tytanowe zachowały wyjściowy kształt oraz parametry wytrzymałościowe. Przeprowadzona analiza XRD wykazała, że składają się one z czystego tytanu i nie zawierają jak poprzednio związków pochodnych (RYS. 5).



RYS. 5. Dyfraktogram XRD dla próbki tytanowej (metoda 2).  
FIG. 5. XRD diffractogram of titanium sample (method 2).

Kolejnym etapem badań było scharakteryzowanie mikrostruktury otrzymanych materiałów. W tym celu przygotowano zgłady metalograficzne, wykonano po kilkanaście mikrofotografii dla każdej próbki i przy pomocy analizy obrazu określono porowatość materiałów oraz rozkład i wielkości porów (RYS. 6).

Na podstawie histogramu (RYS. 7) przedstawiono rozkład wielkości porów w analizowanych próbkach tytanowych.

Widoczne jest, że w obu przypadkach pory z przedziału 50–440  $\mu\text{m}$  stanowią ok. 60% wszystkich występujących w materiale. Taki rozkład wielkości porów jest preferowany dla wrastającej tkanki kostnej i daje szansę na utworzenie złącza biologicznego między materiałem a kością. Otrzymana porowatość jest wprost proporcjonalna do ilości użytego porogenu (ok. 28% dla tytanu z 30% zawartością porogenu 70/30V oraz ok. 25% dla tytanu z 20% zawartością porogenu 80/20A).

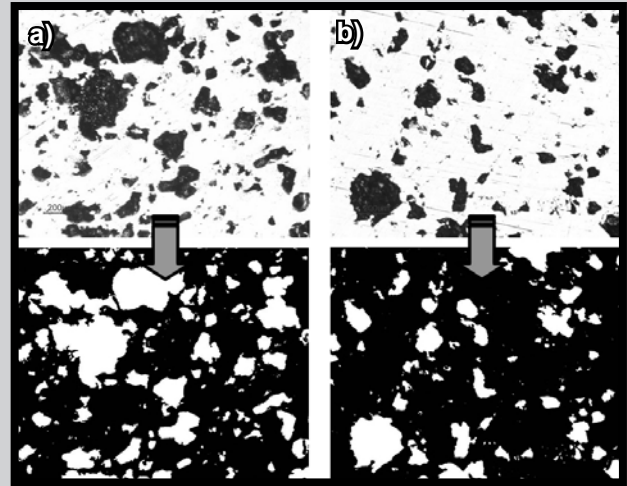
## Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, iż dzięki metodzie metalurgii proszków można otrzymać porowaty tytan (wolny od azotków i tlenków).

Stage III - thermal heating (1250°C, 10°C/min, low vacuum), Stage IV - sintering (1250°C, 2h, high vacuum  $<5 \cdot 10^{-4}$  mbar), Stage V - self cooling (1200 - 700°C  $<5 \cdot 10^{-4}$  mbar, 700-20°C  $<1 \cdot 10^{-2}$  mbar).

Both ways of porogen removal proved to be effective. After die stamping initial cylindrical shape of the samples and their mechanical parameters remained the same. Another XRD analysis revealed that in the samples there was only pure titanium present. No derivative compounds were revealed (FIG. 5).

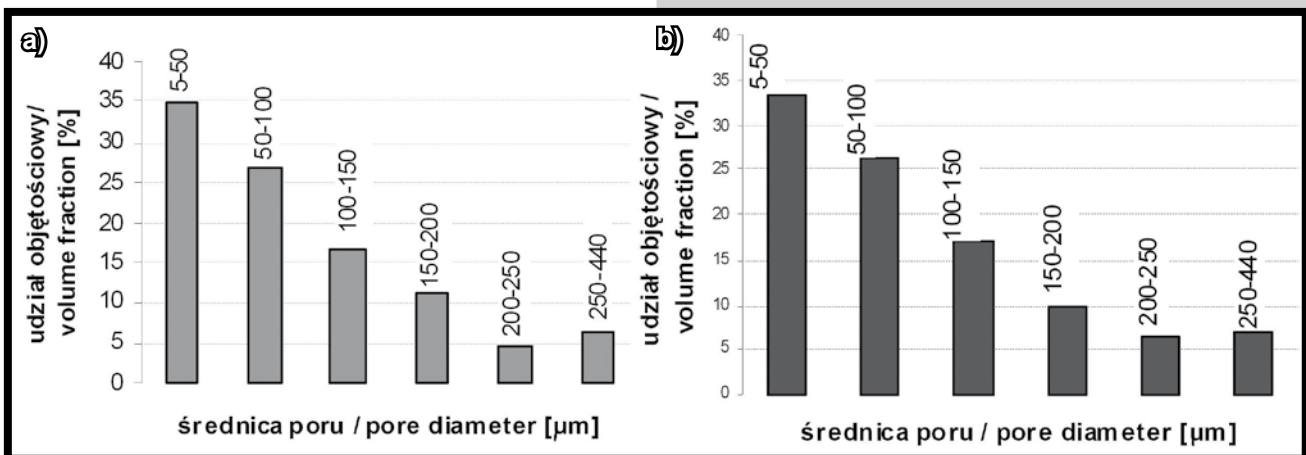
In the next stage of research material's microstructure was characterized. For that reason, metallographic specimens were prepared. Material's porosity (pore size and its distribution) was described by the computer microphotograph software (FIG. 6).



RYS. 6. Mikrofotografie oraz obrazy binarne zgładów a) 70/30V, b) 80/20A.  
FIG. 6. Microphotographs and binary pictures of metallographic specimens a) 70/30V, b) 80/20A.

Histogram presents pores size distribution observed in titanium samples (FIG. 7). In both cases pores in the range of 50–440  $\mu\text{m}$  were about 60% of all present in material. This type of pores distribution is preferred for tissue overgrowing and also gives possibilities for biological joint formation between material and bone.

Obtained porosity was directly proportional to the porogen's amount used (~28% for titanium with 30% of porogen (samples 70/30V), ~25% for titanium with 20% of porogen (samples 80/20A).



RYS. 7. Rozkład wielkości porów w próbkach a) 70/30V, b) 80/20A.  
FIG. 7. Distribution of pores size in the following samples a) 70/30V, b) 80/20A.

Zastosowanie wodorowęglanu amonu jako porogenu pozwoliło na uzyskanie założonej porowatości i odpowiedniego z punktu widzenia fiksacji z tkanką kostną rozkładu wielkości porów.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu Nr. 103/GRE/2007/02.

## Piśmiennictwo

- [1] K. Anselme, *Biomaterials* 2000, 21(7):667.  
 [2] S. Fujibayashi, M. Neo, H. M. Kim, T. Kokubo And T. Nakamura, *Biomaterials* 25 (2004); 443.  
 [3] L. J. Gibson And M.F. Ashby, In "Cellular Solids: Structure And Properties", 2nd Edn. (1997); Pp.1.

## Conclusions

Results proved that powder metallurgy process allows to fabricate porous titanium without oxides and nitrogen formations. It was revealed that ammonium carbonate is a very good porogen and creates complex porosity in titanium samples. That kind of microstructure is thought to be favourable for cell overgrowing and fixation.

## Acknowledgements

This study was supported by grant No.103/GRE/2007/02.

## References

- [4] Itala Ai, Ylanen Ho, Ekholm C, Karlsson Kh, Aro Ht. *J Biomed Mater Res* (2001); 58:679–83.  
 [5] F. Li, Q. L. Feng, F. Z. Cui, H. D. Li And H. Schubert, *Surf. Coat. Technol.* 154 (2002); 88.  
 [6] Orturn E.M. Pohler, *Injury, Int. J. Care Injured* 31 (2000); S-1x-13.

## WŁAŚCIWOŚCI WOLNORODNIKOWE GAMMA NAPROMIENIOWANYCH STAŁYCH POSTACI LEKÓW

SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>,  
MARTA PTASZKIEWICZ<sup>2</sup>, JAN SWAKOŃ<sup>2</sup>, PAWEŁ OLKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ, ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup> ZAKŁAD FIZYKI RADIACYJNEJ I DOZYMETRII,  
INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ PAN,  
UL. RADZIKOWSKIEGO 152, 31-342 KRAKÓW, POLSKA

\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

W nowoczesnej medycynie opracowano i rozwinięto szereg metod wyjaławiania substancji leczniczych. Jedną z nich jest sterylizacja poprzez gamma napromieniowanie. Wyjaławianie za pomocą promieniowania jonizującego jest metodą stosowaną przeważnie w odniesieniu do produktów termolabilnych, ponieważ promieniowanie to, tylko nieznacznie podnosi temperaturę wyjaławianych substancji [1-7]. Metoda ta ma także duże uzasadnienie ekonomiczne, między innymi ze względu na możliwość sterylizacji produktów w ich docelowych opakowaniach. Jest więc coraz szerzej stosowana na międzynarodowym rynku leków [3, 6-7].

Jałowość produktu nie jest terminem absolutnym oznaczającym, że prawdopodobieństwo znalezienia na lub/ w nim zdolnego do życia mikroorganizmu wynosi zero. To, jakie produkty można uznać za jałowe, opisują Normy Polskie i Europejskie, normy ISO oraz normy branżowe. Napromieniowanie leków, czy innych produktów medycznych, promieniowaniem jonizującym o odpowiedniej dawce i w odpowiednich warunkach prowadzi do osiągnięcia stanu sterylności [1-4].

## FREE RADICALS PROPERTIES OF GAMMA IRRADIATED SOLID FORMS OF DRUGS

SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>,  
MARTA PTASZKIEWICZ<sup>2</sup>, JAN SWAKOŃ<sup>2</sup>, PAWEŁ OLKO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF RADIATION PHYSICS AND DOSIMETRY,  
INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS, PAS,  
152 RADZIKOWSKIEGO STR., 31-342 CRACOW, POLAND

\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

In modern medicine a number of methods pharmaceutical substances sterilization processes were developed. One of them is gamma irradiation. Radiosterilization is usually used for thermolabile products because gamma rays causes only small temperature rise in sterilized substances [1-7]. This method also brings economic profits because it is possible to sterilize drugs in their final containers. This is the reason why it is more actively used now that any time in international market of drugs [3, 6-7].

Sterility is not absolute term meaning that probability finding on or/and in it viable forms of life equals zero. Which products can be defined as sterile are described by Polish Norms, European Norms, ISO norms and brand norms. Irradiation of drugs or other medical products by gamma rays in proper dose and conditions leads to its sterility [1-4]. Radiosterilization as a method of solid form of drugs sterilization has a lot of advantages. First of all isothermal course of sterilization process. During gamma irradiation sterilize substance has no direct contact with chemical compounds. This is the reason why in finally sterilized material there is no chemical contaminations [7]. Besides it is possible to sterilized finally packed products – because of high

Za gamma napromieniowaniem, jako metodą sterylizacji stałych postaci leków, przemawia szereg zalet tej metody. Przede wszystkim izotermiczność procesu wyjaławiania. Gamma napromieniowanie jest procesem, w którym wyjaławiana substancja nie ma bezpośredniego kontaktu z żadnymi odczynnikami chemicznymi. W związku z tym, w finalnie wysterylizowanym materiale nie pozostają żadne zanieczyszczenia chemiczne [7]. Ponadto można napromieniowywać już zapakowane produkty - ze względu na wysokie zdolności przenikania promieniowania gamma - co jest niezwykle korzystne z ekonomicznego punktu widzenia [3,6,7]. Produkty medyczne wyjaławiane radiacyjnie nie są w żadnym stopniu radioaktywne [7]. Za wysoką skutecznością tej metody sterylizacji przemawia fakt, że wszystkie mikroorganizmy są w mniejszym lub większym stopniu wrażliwe na promieniowanie gamma [8].

Pomimo coraz szerszego zastosowania radiosterylizacji, nie ma spójnych przepisów, które precyzyjnie i jednoznacznie regulowałyby zagadnienia radiosterylizacji na międzynarodowym rynku leków. Wymagania dotyczące sterylizacji radiacyjnej są różne w poszczególnych krajach [7].

Według normy PN-EN 552 produkt medyczny powinien być napromieniowany dawką nie mniejszą niż 25kGy, a odpowiednią dawkę sterylizacyjną wybiera główny wytwórca wyrobu medycznego na podstawie prac eksperymentalnych [9]. Ważne jest jednak zwrócić uwagę, że już dawka 25 kGy może powodować zmiany w strukturze chemicznej cząsteczki. Konsekwencją zmiany struktury chemicznej napromieniowanych substancji (niezależnie od pochłoniętej dawki) może być [1]:

- zanieczyszczenie sterylizowanej próbki produktami rozkładu,
- powstawanie toksycznych pochodnych,
- zmiany parametrów farmakokinetycznych sterylizowanej substancji.

Każda taka zmiana dyskwalifikuje substancję leczniczą z możliwości sterylizacji radiacyjnej. Wśród produktów rozkładu zanieczyszczających radiacyjnie wyjaławiane substancje mogą znajdować się bardzo niebezpieczne wolne rodniki. Znajomość układu wolnych rodników w substancjach poddanych działaniu promieniowania gamma jest więc niezwykle istotna dla doboru metody i parametrów sterylizacji poszczególnych leków. Metodą, która pozwala na ilościowe i jakościowe pomiary wolnych rodników w gamma napromieniowanych substancjach leczniczych jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR).

Widma EPR badanych substancji leczniczych rejestrowano w temperaturze pokojowej dla próbek w powietrzu. Dla przykładowych leków, celem wyjaśnienia wpływu tlenu na charakter zmian w układzie wolnych rodników, rejestrowano widma EPR dla próbek w atmosferze argonu.

Pomiary widm EPR badanych leków wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego typu SE/X z modulacją pola magnetycznego 100kHz (RADIOPAN, Poznań). Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem typu MCM 101 (EPRAD, Poznań).

Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji stosując promieniowanie mikrofalowe o mocy wynoszącej 2 mW, dla której nie obserwujemy nasycenia mikrofalowego sygnału. Całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez kłistron wynosiła 70 mW.

penetrating abilities – what is very advantageous for economic point of view [3,6,7]. Products sterilized by irradiation are not radioactive [7]. This method is so efficient because all microorganisms are more or less radiosensitive [8]. Though more frequent using radiosterilization there are no compact regulation which unequivocally and precisely regulate radiosterilization problems on international market of drugs. Radiosterilization requirements are varied in different countries [7]. According to PN-EN 552 norm medical product should be irradiated with dose at least 25 kGy, and proper sterilization dose is chosen by main product producer based on experimental works [9]. But it is important that even dose of 25kGy can cause changes in chemical structure of molecule. Changes of chemical structure irradiated molecule can result with (independently from absorbed dose):

- decontamination of sterilized sample with degradation products
- creating toxic derivatives
- changes of pharmacokinetics parameters in sterilized substance.

Every such change disables medical substance from possibility of radiosterilization.

Among decomposition products contaminating radiosterilized substances very dangerous free radicals can be present. Information about free radicals systems in radiosterilized substances is very important to determine method and parameters drug sterilization. EPR spectroscopy is method which brings information about types and amount of free radicals in radiosterilized drugs. EPR spectra of studied drugs were recorded at room temperature. For exemplary drugs, to explain influence oxygen on free radicals system changes, EPR spectra were recorded in argon atmosphere.

Measurements of spectra were done by the use of electron paramagnetic resonance spectrometer SE/X type produced by RADIOPAN Firm (Poznań) with modulation of magnetic field of 100kHz. Microwave frequency was evaluated using MCM 101 frequency recorder produced by RADIOPAN - Poznań. The first-derivative EPR spectra were recorded with low microwave power 2mW to avoid the microwave saturation. Total microwave power produced by klystron was about 70mW.

In presented studies samples were gamma irradiated by THERATRON 780E containing isotope  $^{60}\text{Co}$ . According to PN-EN 552 norm dose of gamma irradiation absorbed by all samples were 25kGy.

The performed spectroscopic studies shows that dose of 25kGy generate free radicals in all tested substances. Visible differences in free radicals concentrations in different substances were observed. For example the lowest free radicals concentrations characterize irradiated penicillin derivatives: piperacillin, ampicillin and crystal penicillin and the highest free radicals concentrations – only a slight resistant against gamma irradiation were obtained for irradiated aminoglycoside antibiotics: sisomicin, tobramycin, and paromomycin.

It is important that free radicals concentrations in the studied gamma irradiated antibiotics decrease with increasing of storage time. Interactions with oxygen may be responsible for decrease of free radicals concentrations and kinetics of this phenomena can be describe by exponential functions. Performed studies point that free radicals concentrations decay in irradiated sample can be described by exponential

W prezentowanych badaniach próbki zostały gamma napromieniowane przy użyciu aparatu kobaltowego THERATRON 780E zawierającego izotop kobaltu  $^{60}\text{Co}$ . Zgodnie z normą PN-EN 552 [9] dawka promieniowania pochłonięta przez wszystkie badane antybiotyki wynosiła 25kGy.

Przeprowadzone pomiary wskazują, dawka 25 kGy powoduje powstawanie wolnych rodników niezależnie od substancji leczniczej. Zarejestrowano natomiast wyraźne różnice w koncentracji wolnych rodników dla różnych substancji leczniczych. Przykład mogą stanowić tu pochodne penicyliny (piperacylina, ampicylina, penicylina krystaliczna) gdzie zarejestrowano najniższe koncentracje wolnych rodników oraz antybiotyki aminoglikozydowe (sisomicyna, tobramycyna, paromomycyna), które okazały się najmniej odporne na promieniowanie gamma – najwyższe koncentracje wolnych rodników wśród badanych próbek.

Ważną obserwacją płynącą z niniejszych badań jest fakt, że koncentracja wolnych rodników w analizowanych substancjach leczniczych maleje ze wzrostem czasu przechowywania napromieniowanej próbki. Zjawisko to spowodowane jest prawdopodobnie oddziaływaniem z tlenem a jego kinetykę, można satysfakcjonująco opisać funkcją eksponencjalną. Badania wskazują, że spadek koncentracji wolnych rodników w próbce może to być opisany zależnością jednoeksponecjonalną – jeden typ wolnych rodników, bądź dwueksponecjonalna – dwa typy wolnych rodników. Ocena współczynników występujących w równaniach opisujących zmiany ilościowe w układzie wolnych rodników gamma napromieniowanych substancji leczniczych wskazują, że najszybszy spadek ilości wolnych rodników jest charakterystyczny dla gamma napromieniowanych antybiotyków pochodnych penicyliny: piperacyliny, ampicyliny i penicyliny krystalicznej.

Ponadto analiza parametrów spektroskopowych (zależności amplitudy linii i szerokości linii od mocy mikrofalowej) wskazuje, że wolne rodniki w badanych substancjach rozmieszczone są jednorodnie.

Metodą ciągłego nasycenia mikrofalowego linii EPR wykazano, że wolne rodniki w badanych lekach poddanych działaniu promieniowania gamma różnią się szybkością procesów relaksacji spin-sieć. Oddziaływania magnetyczne spin-sieć zachodzą stosunkowo najszybciej w penicylinie krystalicznej, ampicylinie i piperacylinie.

Dla wszystkich analizowanych leków zarejestrowano stosunkowo szerokie linie EPR. Szerokie linie wskazują na niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami w gamma napromieniowanych lekach.

**[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 52-54]**

function – one type of free radicals in the sample or by biexponential function – two types of free radicals in irradiated sample. Evaluation of parameters describing free radicals amount changing with storage time increasing in gamma irradiated substances point that the fastest decrease of free radicals concentrations is characteristic for penicillin derivatives: piperacillin, ampicillin and crystal penicillin. Besides EPR spectra parameters analysis (influence of microwave power on amplitude and linewidth of EPR lines) indicate on free radicals homogenous distribution.

It was stated, using continuously microwave power saturation method, that free radicals in studied gamma irradiated drugs differ with spin – lattice relaxation processes. The fastest spin – lattice magnetic interactions proceed in piperacillin, ampicillin and crystal penicillin.

For all analyzed drugs relatively broad EPR lines were recorded. Broad EPR lines point out on small distance between free radicals in gamma irradiated drugs.

**[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 52-54]**

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Basly JP, Longy I, Bernard M. ESR identification of radiosterilized pharmaceuticals: latamoxef and ceftriaxone. *Int J Pharm* 1997; 158: 241 – 245.
- [2] Basly JP, Basly I, Bernard M. ESR spectroscopy applied to the study of pharmaceuticals radiosterilization: cefoperazone. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17: 871 – 875.
- [3] Basly JP, Basly I, Bernard M. Influence of radiation treatment on dobutamine. *Int J Pharm* 1998; 170: 265 – 269.
- [4] Gibella M, Crucq AS, Tilquin B, Stocker P, Lesgards G, Raffi J. Electron spin resonance of some irradiated pharmaceuticals. *Radiat Phys Chem* 2000; 58: 69 – 76.
- [5] Varshney L, Dodke PB. Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization. *Radiat Phys Chem* 2004; 71: 1103 – 1111.
- [6] Fauconnet AL, Basly JP, Berdard M. Gamma radiation induced effects on isoproterenol. *Int J Pharm* 1996; 144: 123 – 125.
- [7] Basly JP, Basly I, Bernard M. Electron spin resonance identification of irradiated ascorbic acid: Dosimetry and influence of powder fineness. *Anal Chim Acta* 1998; 372: 373 – 378.
- [8] Farkas J. Microbiological of irradiated foods. *Int J Microbiol* 1989; 9: 1 – 45.
- [9] PN-EN 552. Sterylizacja wyrobów medycznych. Walidacja i rutynowa kontrola sterylizacji metodą napromieniowania. Warszawa: Polski Komitet Normalizacyjny; 1999.

## ZASTOSOWANIE SPEKTROSKOPII EPR DO BADANIA DEKSAMETAZONU STERYLIZOWANEGO TERMICZNIE

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, BARBARA PILAWA,  
SŁAWOMIR WILCZYŃSKI

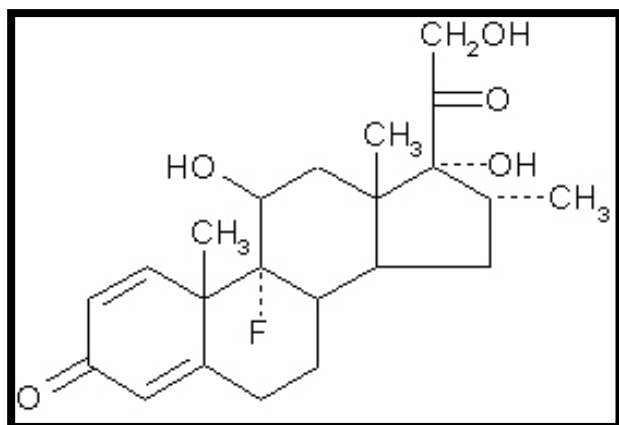
KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY  
LABORATORYJNEJ,  
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZYNY W KATOWICACH,  
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

Spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) zastosowano do oceny optymalnych warunków sterylizacji deksametazonu. Sterylizację sproszkowanego leku wykonano w suchym powietrzu w temperaturze 180°C w czasie wynoszącym 30 minut. Celem pracy jest określenie właściwości wolnorodnikowych sterylizowanego deksametazonu. Optymalnym warunkom sterylizacji powinno towarzyszyć powstawanie niewielkiej ilości wolnych rodników w substancji leczniczej, które mogą powodować szereg efektów ubocznych podczas farmakoterapii.

Deksametazon jest syntetycznym glikokortykosteroidem z grupy hormonów steroidowych. Wykazuje silne działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne. Jest silniejszy ok. 20-30-krotnie przewyższając hydrokortyzon i 4-5 krotnie niż prednizolon. Deksametazon hamuje zapalenie i obrzęk tkanki, dlatego jest używany do leczenia zapaleń o szerokim zakresie chorób autoimmunologicznych takich zapalenie stawów itp. Jest również aplikowany małych ilościach przed lub po zabiegach dentystrycznych. W onkologii deksametazon jest podawany w trakcie chemioterapii [1,2].

Strukturę chemiczną deksametazonu przedstawiono na RYSUNKU 1.

Pomiary widm wykonano za pomocą spektrometru EPR Firmy RADIOPAN (Poznań) przy modulacji pola magnetycznego wynoszącej 100kHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego wynosiła 9.3GHz. Widma EPR w postaci pierwszej pochodnej rejestrowano w szerokim zakresie mocy mikrofalowej 0.7-70mW. Analizowano parametry widm EPR oraz koncentrację wolnych rodników w sterylizowanym leku.



RYS. 1. Struktura chemiczna X deksametazonu [3].  
RYS. 1. Chemical structure of dexamethasone [3].

## APPLICATION OF EPR SPECTROSCOPY TO EXAMINATION OF THERMALLY STERILIZED DEXAMETHASONE

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, BARBARA PILAWA,  
SŁAWOMIR WILCZYŃSKI

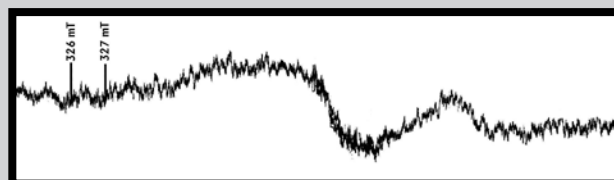
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,  
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was applied to examine optimal sterilization conditions of dexamethasone. Sterilization of powdered dexamethasone was done in dry air at temperature 180°C during the time of 30 minutes. The aim of this work was to determine free radical properties of sterilized dexamethasone. It is expected that optimal conditions of sterilization is accompanied by formation of low amount of free radicals in drug which can cause many side effects during pharmacotherapy.

Dexamethasone is a potent synthetic member of the glucocorticoid class of steroid hormones. It acts as an anti-inflammatory and immunosuppressant. Its potency is about 20-30 times that of hydrocortisone and 4-5 times of prednisone. Dexamethasone inhibit the inflammatory and the edema of the tissue, so its making useful for the treatment of a wide range of inflammatory and auto-immune conditions such as rheumatoid arthritis ect. It is also given in small amounts before and/or after some forms of dental surgery. In oncology dexamethasone, it is given to cancer patients undergoing chemotherapy [1,2].

Chemical structure of dexamethasone is presented in FIGURE 1.

Measurements of spectra were done by the use of EPR spectrometer produced by RADIOPAN Firm (Poznań) with modulation of magnetic field of 100 kHz. Microwave frequency of 9.3GHz was applied. The first-derivative EPR spectra were recorded with microwave power of the wide range of 0.7-70mW. Parameters of EPR spectra and free radical concentration in the sterilized drug were analyzed. Changes of free radical concentration and EPR parameters with increasing of storage time after heating of the drug at 180°C were evaluated. Changes of amplitudes and linewidths of EPR spectra with microwave power were determined. The influence of microwave power on lineshape of EPR spectra and line asymmetry was analyzed.



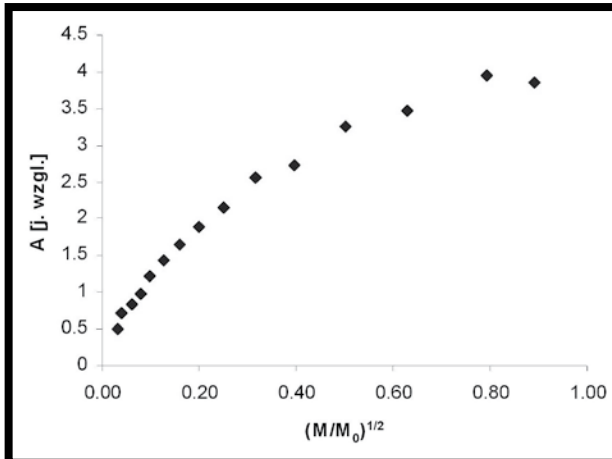
RYS. 2 Widmo EPR termicznie sterylizowanego deksametazonu rejestrowane przy tłumieniu 15dB.

FIG. 2 EPR spectra of thermally sterilized dexamethasone recorded at 15dB attenuation of microwave power.

Zbadano zmiany koncentracji i parametrów widm EPR wraz ze wzrostem czasu przechowywania leku sterylizowanego w 180°C przez 30 minut. Wyznaczono zależność amplitudy i szerokości linii EPR od mocy mikrofalowej. Analizowano wpływ mocy mikrofalowej na kształt i asymetrię widm EPR.

Próbki deksametazonu nie poddane działaniu wysokiej temperatury nie dawały sygnału EPR. Widma EPR deksametazonu sterylizowanego w 180°C przez 30 minut wykazywały złożony charakter (RYS.2). Wskazuje to, że w sterylizowanym deksametazonie występuje kilka rodzajów wolnych rodników. Rejestrowane widma EPR stanowią superpozycję linii składowych pochodzących od poszczególnych typów wolnych rodników.

Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę i szerokość linii EPR termicznie sterylizowanego deksametazonu. Zaobserwowano zmianę kształtu widm EPR wraz z mocą mikrofalową. Wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej rośnie amplituda linii EPR deksametazonu. Podobną zależność zarejestrowano dla szerokości linii EPR. Taki charakter zmian wskazuje na jednorodne rozmieszczenie centrów paramagnetycznych w termicznie sterylizowanym deksametazonie (RYS. 3 i 4).



**RYS. 3.** Wpływ mocy mikrofalowej  $(M/M_0)^{1/2}$  na amplitudę A termicznie sterylizowanego deksametazonu.

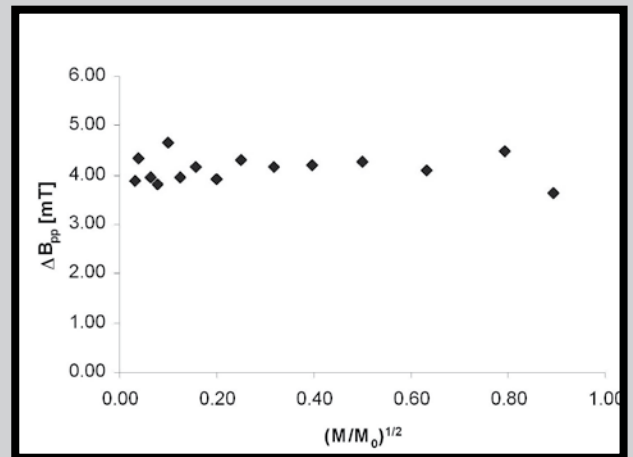
**FIG. 3.** Influence of microwave power  $(M/M_0)^{1/2}$  on line amplitude thermally sterilized dexamethasone.

Linie EPR różnych grup wolnych rodników nasycają się przy innej mocy mikrofalowej. Wolne rodniki w sterylizowanym deksametazonie są stabilne. Nie obserwowano szybkiego zaniku wolnych rodników z czasem przechowywania próbki. Badania EPR wskazują na niewielką zależność asymetrii linii EPR od mocy mikrofalowej. Moc mikrofalowa nieznacznie wpływa na wszystkie analizowane parametry IA1-A2I, IA1/A2I, IB1-B2I, IB1/B2I wyznaczone w pracy w celu oceny asymetrii linii EPR.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 55-56]

Samples of dexamethasone not heated with high temperature gave no EPR signals. EPR spectra of dexamethasone sterilized in 180°C during 30 minutes reveal complex structure (FIG. 2). It was stated that several types of free radicals exist in the sterilized drug. Its EPR spectra reveal multi-component structure. The recorded EPR spectra are superposition of component lines of the individual types of free radicals.

Influence of microwave power on amplitude and linewidths thermally sterilized dexamethasone was tested. Changes of EPR lineshapes with microwave power were observed. Amplitude of EPR line increase with microwave power increasing. Similar relationship for linewidths of EPR lines was recorded. This kind of relationship evidence on homogenous location of paramagnetic centers in thermally sterilized dexamethasone (FIG. 3 and 4).



**RYS. 4.** Wpływ mocy mikrofalowej  $(M/M_0)^{1/2}$  na szerokość  $\Delta B_{pp}$  linii termicznie sterylizowanego deksametazonu.

**FIG. 4.** Influence of microwave power  $(M/M_0)^{1/2}$  on EPR linewidths  $\Delta B_{pp}$  thermally sterilized dexamethasone.

EPR lines of the individual groups of free radicals saturate at different microwave powers. Free radicals in sterilized dexamethasone are stable. EPR studies indicate on small influence of microwave power on line asymmetry. Microwave power only slightly affects on all analyzed parameters IA1-A2I, IA1/A2I, IB1-B2I, IB1/B2I determined to evaluate line asymmetry.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 55-56]

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Podlewski J.K., Chwalibogowska- Podlewska A., Leki współczesnej terapii, Split Tranding, Warszawa, 2008.
- [2] Styczyński J., Glucocorticoid resistance in acute leukemias, Współczesna Onkologia (2003) vol. 7, 4 (312- 316).
- [3] Zejc A., Gorczyca M., Chemia leków, PZWL, Warszawa 2002.

# ANALIZA UKŁADU CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH W TERMICZNIE STERYLIZOWANYM DIKLOFENAKU

BARBARA PILAWA, PAWEŁ RAMOS, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, KATARZYNA CZYŻ

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZNYM  
LABORATORYJNEJ, KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI  
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*Wolne rodniki mogą powstawać m.in. w procesie fotolizy, radiolizy, termolizy i sonolizy oraz w wybranych reakcjach chemicznych [1-3]. Termoliza jest procesem polegającym na hemolitycznym rozpadzie wiązania kowalencyjnego w cząsteczce w wyniku zaabsorbowanej energii cieplnej [2,3]. Zjawisko takie może zachodzić podczas termicznej sterylizacji leków, a produkty rozpadu cząsteczki, w tym szczególnie niebezpieczne wolne rodniki, mogą zanieczyszczać sterylizowaną substancję leczniczą. Wolne rodniki zawarte w substancji leczniczej mogą powodować w organizmie efekty toksyczne. Nie znane są właściwości wolnych rodników w większości sterylizowanych substancji leczniczych. W niniejszej pracy wykonano analizę układu wolnych rodników w sterylizowanym termicznie diklofenaku.*

*Diklofenak należy do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych - NLPZ [4]. Wykazuje silne działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe. Diklofenak wiąże się z dwoma izoformami cyklooksygenazy (COX 1 i COX 2) poprzez co blokują syntezę prozapalnych prostaglandyn z kwasu arachidonowego.*

*Techniką pozwalającą na ocenę koncentracji wolnych rodników zanieczyszczających termicznie sterylizowane substancje lecznicze jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR. Pomiar EPR wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) produkcji RADIOPAN-Poznań. Zastosowano modulację pola magnetycznego wynoszącą 100kHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM 101 produkcji RADIOPAN-Poznań.*

*Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji przy wysokim tłumieniu 15B, aby uniknąć nasycenia mikrofalowego linii. W pracy wykonano badania wolnych rodników w diklofenaku sterylizowanym termicznie. Sterylizację termiczną leku prowadzono w sterylizatorze z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 180°C. Próbkę ogrzewano w czasie 30 minut.*

*Dla diklofenaku wyjściowego nie poddanego obróbce termicznej nie rejestrowano widm EPR. Oznacza to, że w badanej substancji leczniczej nie występują wolne rodniki. Widma EPR diklofenaku ogrzewanego w temperaturze 180°C charakteryzowała wysoka asymetria. W pracy zbadano zmiany tej asymetrii w zależności od stosowanej mocy mikrofalowej. Zdefiniowano następujące parametry asymetrii poddane analizie:  $A_1/A_2$ ,  $A_1-A_2$ ,  $B_1/B_2$ ,  $B_1-B_2$ . Zasady wyznaczania parametrów asymetrii pokazano na RYSUNKU 1.*

# FREE RADICALS SYSTEM ANALYSIS IN THERMALLY STERILIZED DICLOFENAC

BARBARA PILAWA, PAWEŁ RAMOS, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, KATARZYNA CZYŻ

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

*Free radicals can be generated in photolysis, radiolysis, thermolysis and sonolysis processes and during some chemical reactions [1-3]. Thermolysis is defined as homolytic dissociation of covalent bond as result of thermal energy absorption [2,3]. This phenomenon can proceed during thermal drug sterilization, and degradation products, especially dangerous free radicals, can decontaminate of medicinal substance. Free radicals in medicinal substance can cause toxic effects in human body. Properties of free radicals in the most of sterilized medicinal substances are unknown. In the present study free radicals system of thermally sterilized diclofenac was performed.*

*Diclofenac belongs to non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) [4]. Diclofenac has analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities. Diclofenac binds to and chelates both isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2), thereby blocking the conversion of arachidonic acid (AA) to pro-inflammatory prostaglandins.*

*Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) was applied as the experimental technique to evaluate concentration of free radicals decontaminating thermally sterilized medicinal substance. Measurements of EPR spectra were done by the use of EPR spectrometer at X-band (9.3GHz) produced by RADIOPAN Firm (Poznań). Modulation of magnetic field of 100kHz was applied. Microwave frequency was evaluated using MCM 101 frequency recorder produced by RADIOPAN - Poznań.*

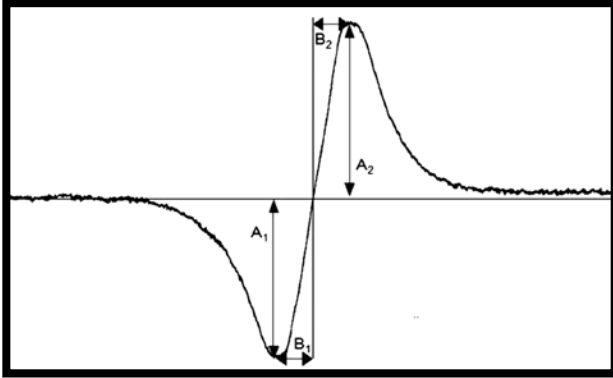
*The first-derivative EPR spectra were recorded with high microwave power attenuation 15dB to avoid the microwave saturation. In the present study free radicals in thermally sterilized diclofenac were studied. Thermal sterilization of the drug was performed in hot air oven with air circulating at 180°C. Sample was heated during 30 minutes.*

*Samples of diclofenac not heated with high temperature gave no EPR signals. It indicates that stable free radicals do not exist in initial medicinal substance. The EPR spectra of high temperature operated diclofenac are characterized by high asymmetry. In present study dependence of asymmetry on microwave power was investigated. Following parameters of asymmetry were analyzed:  $A_1/A_2$ ,  $A_1-A_2$ ,  $B_1/B_2$ ,  $B_1-B_2$ . Principles of asymmetry parameters determination were performed on FIGURE 1.*

*On FIGURE 1 dependence of EPR lines  $A_1/A_2$  (a) and  $B_1/B_2$  parameters on microwave power  $M/M_0$  in relative units stated were performed.*

*It was shown that these parameters strongly depend on microwave power. Changes of asymmetry line parameters indicates presence of a few types of free radicals in thermally sterilized diclofenac.*





RYS. 1. Analizowane parametry asymetrii ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ) widm EPR diklofenaku sterylizowanego termicznie.

FIG. 1. Analyzed asymmetry parameters ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ) for EPR spectra of thermally sterilized diclofenac.

Na RYSUNKU 1 a i b przedstawiono zależność parametrów  $A_1/A_2$  i  $B_1/B_2$ , od mocy mikrofalowej wyrażonej w jednostkach względnych ( $M/M_0$ ).

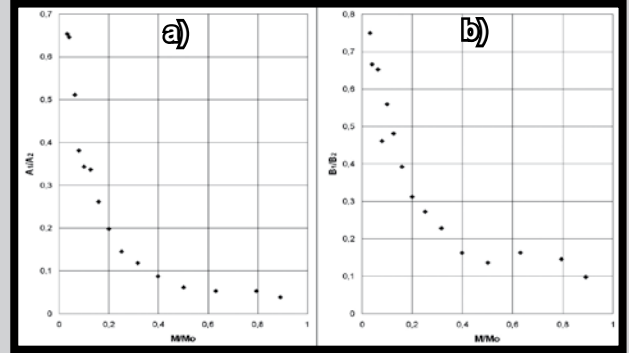
Widać wyraźnie, że parametry te zależą w znacznym stopniu od mocy mikrofalowej. Wszystkie zbadane parametry maleją ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zmiana parametrów asymetrii kształtu linii EPR wskazuje na występowanie więcej niż jednej grupy wolnych rodników w sterylizowanym termicznie diklofenaku. Średni współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  wynoszący 2,0027 świadczy, że niesparowane elektrony zlokalizowane są na atomach tlenu.

Zarejestrowano również wpływ mocy mikrofalowej na podstawowe parametry linii EPR termicznie sterylizowanego diklofenaku. Amplituda linii EPR rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej, osiąga wartość maksymalną, a następnie maleje ze wzrostem mocy mikrofalowej. Szerokość linii EPR diklofenaku rośnie ze wzrostem mocy mikrofalowej. Zależności te są charakterystyczne dla wolnych rodników rozmieszczonych jednorodnie w próbce. Oznacza to, że wykonany proces sterylizacji termicznej powoduje generowanie wolnych rodników w całej objętości próbki.

Otrzymane wyniki badań spektroskopowych z wykorzystaniem metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego wskazują na silne oddziaływanie magnetyczne spin-spin w sterylizowanym diklofenaku. Oddziaływania te poszerzają linie EPR ( $\Delta B_{pp} = 0,80 \text{ mT}$ ) i są charakterystyczne dla wolnych rodników położonych blisko siebie w strukturze molekularnej leku.

Przeprowadzone analizy pozwalają wyciągnąć następujące wnioski: sterylizacja termiczna diklofenaku w temperaturze  $180^\circ\text{C}$  powoduje powstawanie wolnych rodników w leku. Wolne rodniki nie występują w diklofenaku nie poddanym sterylizacji. Zmian asymetrii linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej jest charakterystyczna dla złożonego układu wolnych rodników w próbce. Wolne rodniki w sterylizowanym termicznie diklofenaku są rozmieszczone jednorodnie, na co wskazuje charakter zmian parametrów linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej. Wolne rodniki w sterylizowanym termicznie diklofenaku są rozmieszczone blisko siebie, na co wskazuje poszerzenie dipolowe linii EPR. W diklofenaku sterylizowanym termicznie zachodzą wolne procesy relaksacji spin-ście. Spektroskopia EPR jest metodą przydatną do oceny właściwości wolnorodnikowych sterylizowanego termicznie diklofenaku.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-82, (2008), 57-58]



RYS. 2. Zależność parametrów  $A_1/A_2$  (a),  $B_1/B_2$  (b) linii EPR od mocy mikrofalowej  $M/M_0$  dla badanej próbki diklofenaku sterylizowanej termicznie.

FIG. 2. Dependence of EPR lines  $A_1/A_2$  (a),  $B_1/B_2$  (c) parameters on microwave power  $M/M_0$  for thermally sterilized diclofenac.

Mean  $g$ -factor with 2.0027 value indicates that unpaired electrons are located on oxygen atoms.

Influence of microwave power on basis EPR parameters for thermally sterilized diclofenac was recorded. Amplitude rises with microwave power increase, reaches maximum value and then decreases with microwave power increase. This kind of relationship indicates that free radicals are homogeneously spread in whole sample. It means that thermal sterilization processes generate free radicals in whole volume of the sample.

Received spectroscopic results obtained by electron paramagnetic spectroscopy application indicates on strong spin-spin magnetic interactions in sterilized diclofenac. This interactions causing broadening EPR lines ( $\Delta B_{pp} = 0,80 \text{ mT}$ ) are characteristic for close located free radicals in molecular structure of the drug.

The results of the conducted studies allow the statement that: thermal sterilization at  $180^\circ\text{C}$  produce free radicals in diclofenac. Free radicals do not exist in non-sterilized diclofenac. Changes of line asymmetry are characteristic for complex free radicals system in the sample. Changes of EPR line parameters indicate on homogenous spread of free radicals in thermally sterilized diclofenac. Broadening EPR lines inform that free radicals are close located to each other. Slowly spin-lattice relaxation processes proceed in thermally sterilized diclofenac. EPR spectroscopy is useful technique to evaluation free radicals properties in thermally sterilized diclofenac.

[Engineering of Biomaterials, 81-82, (2008), 57-58]

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Martyn S., Spektroskopia EPR w chemii i biochemii. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1987; 136-141.
- [2] Rozancew E., Szolle W., Chemia organiczna wolnych rodników. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 1985; 14-53.
- [3] Bartosz G., Druga twarz tlenu. Warszawa : Wydawnictwo Naukowe PWN; 2003; 58-62.
- [4] Podlewski J., Chwalibogowska-Podlewaska A., Leki współczesnej terapii. Warszawa : Split Trading; 2007; 221-222.

# BADANIA WOLNYCH RODNIKÓW POLIMERÓW MELANINOWYCH W PRODUKTACH KOSMETYCZNYCH Z ZASTOSOWANIEM SPEKTROSKOPII ELEKTRONOWEGO REZONANSU PARAMAGNETYCZNEGO

EWA CHODUREK<sup>1</sup>, DARIA CZYŻYK<sup>2</sup>, BARBARA PILAWA<sup>2</sup>, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>2</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1,  
 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, UL. JEDNOŚCI 8,  
 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

Przeprowadzono badania wolnych rodników występujących w polimerach melaninowych stosowanych w kosmetologii i medycynie estetycznej [1-2]. Wolne rodniki posiadają niesparowane elektrony, które powodują ich wysoką aktywność biochemiczną. Paramagnetyczne melaniny [3-9] mogą odpowiadać za reakcje wolnorodnikowe zachodzące w komórkach skóry oddziałujących z kosmetykiem. Reakjom wolnorodnikowym mogą towarzyszyć efekty toksyczne w tkankach. Wiedza o właściwościach wolnych rodników w melaninach jest więc bardzo ważna z medycznego punktu widzenia. Celem niniejszej pracy jest określenie koncentracji i właściwości wolnych rodników w polimerach melaninowych oraz ich oddziaływań z innymi składnikami kosmetyku.

Jako technikę eksperymentalną zastosowano spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na pasmo X (9.3GHz) (RYS. 1).



RYS. 1. Spektrometr elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na pasmo X.  
 FIG. 1. An X-band electron paramagnetic resonance spectrometer.

Dla badanych próbek wyznaczono koncentrację wolnych rodników, współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$ , amplitudę, intensywność integralną oraz szerokość linii EPR.

Jako wzorzec koncentracji zastosowano ultramarynę i kryształ rubinu (RYS. 2).

# ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE STUDIES OF FREE RADICALS OF MELANIN POLYMERS IN COSMETIC PRODUCTS

EWA CHODUREK<sup>1</sup>, DARIA CZYŻYK<sup>2</sup>, BARBARA PILAWA<sup>2</sup>, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI<sup>2</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
 1 NARCYZOW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

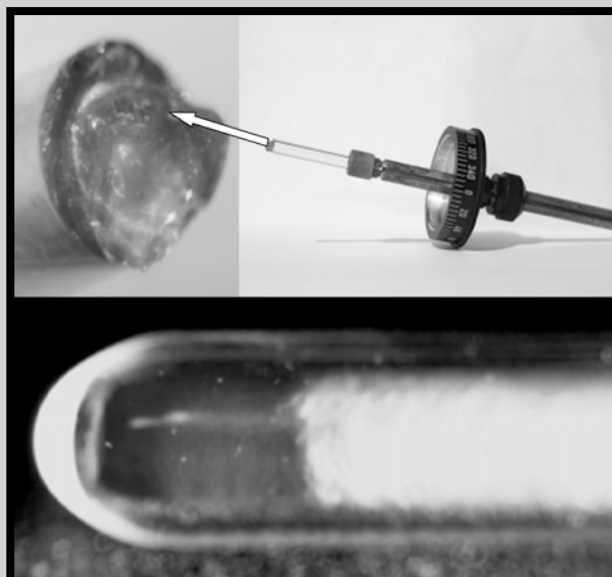
Free radicals existing in melanin polymers used in cosmetology and esthetical medicine were examined [1-2]. Free radicals contain unpaired electrons, which causes their high biochemical activity.

Paramagnetic melanin [3-9] may be responsible for free radical reactions in skin cells interacting with the cosmetic. Free radical reactions may be accompanied by toxic effects in tissues. Knowledge about free radical properties in melanins is very important from medical point of view. The aim of this works is to determine concentration and properties of free radicals in melanin polymers and their interactions with others components of cosmetic.

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) at X-band (9.3GHz) was applied as the experimental technique (FIG. 1).

For the analysed samples free radical concentration,  $g$  factor, amplitude, integral intensity and linewidth od EPR spectra were determined.

Ultramarine and a ruby crystal were used as the references for free radical concentration (FIG. 2).



RYS.2. Paramagnetyczna ultramaryna i kryształ rubinu.  
 FIG. 2. Paramagnetic ultramarine and a ruby crystal.

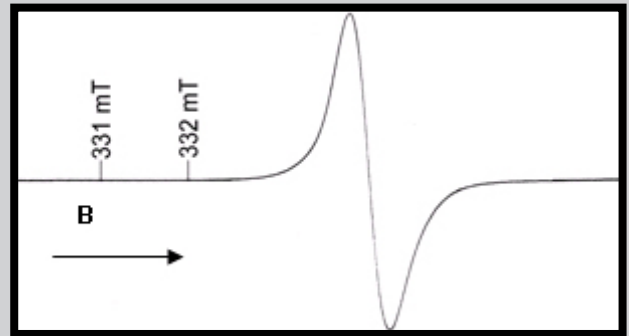
EPR spectra of melanin samples were measured at the wide range of microwave power of 0.7-70mW. EPR spectra of melanin were the broad asymmetric lines.

Widma EPR melanin rejestrowano w szerokim zakresie mocy mikrofalowych wynoszącym 0.7-70W. Widma EPR melanin są szerokimi asymetrycznymi liniami. Przykładowe widmo EPR modelowej eumelaniny – DOPA-melaniny pokazano na RYS. 3.

Badania metodą EPR wykazały, że w polimerach melaninowych występują głównie o-semichinonowe wolne rodniki o niesparowanym elektronie zlokalizowanym na atomie tlenu. Otrzymano charakterystyczne dla tego rodzaju wolnych rodników wartości współczynnika rozszczepienia spektroskopowego z zakresu 2.0045-2.0050. Silne sygnały EPR rejestrowano zarówno dla melaniny syntetycznej jak i naturalnej. Wysoka koncentracja wolnych rodników w analizowanych polimerach jest rzędu  $10^{18}$ - $10^{19}$  spin/g. Nasylenie mikrofalowe widm EPR wskazuje na jednorodne rozmieszczenie wolnych rodników w polimerach melaninowych. Wolne rodniki w melaninach są położone blisko siebie, co powoduje poszerzenie ich linii EPR. Wykazano, że wolne rodniki melanin oddziałują ze innymi składnikami kosmetyków. Dowodem wskazującym na w/w oddziaływania jest zmiana parametrów widm EPR melaniny w zależności od środowiska fizykochemicznego, w którym polimery te występują.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 59-60]

Exemplary spectrum of model eumelanin – DOPA-melanin is presented in FIGURE 3.



RYS. 3. Widmo EPR DOPA-melaniny. B – indukcja pola magnetycznego.

FIG. 3. EPR spectrum of DOPA-melanin. B – induction of magnetic field.

EPR studies point out that o-semiquinone free radicals with unpaired electrons localized on oxygen atoms mainly exist in melanin polymers. g-Values characteristics for this type of free radicals in the range 2.0045-2.0050 were obtained. Strong EPR signals were recorded for both synthetic and natural melanin. High free radical concentration in the analyzed polymers is about  $10^{18}$ - $10^{19}$  spin/g. Microwave saturation of EPR spectra indicates homogeneous distribution of free radicals in melanin polymers. Free radicals in melanins are nearly located, what causes broadening of their EPR lines. It was pointed out that melanin free radicals interact with others components of cosmetics. The interactions are stated by changes of parameters of melanin EPR spectra relative to their physicochemical environment.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 59-60]

## Piśmiennictwo

- [1] L. Baumann L., Cosmetic Dermatology 2002.
- [2] J. Gibka, Wykorzystanie melaniny i procesu melanogenezy w kosmetyce, Polish Journal of Cosmetology 2000, 3, 164-176.
- [3] E. Chodurek, B. Pilawa, A. Dzierżęga-Lęcznar, S. Kurkiewicz, L. Świątkowska, T. Wilczok, Effect of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions on DOPA-melanin structure as analyzed by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry and EPR spectroscopy, Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 2003, 70(1), 43-54.
- [4] B. Bilińska, B. Pilawa, Z. Zawada, E. Wylęgała, T. Wilczok, A. E. Dontsov, N. L. Sakina, M. A. Ostrovsky, V. B. Ilyasova, Electron spin resonance investigations of human retinal pigment epithelium melanosomes from young and old donors, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2002, 58(10), 2257-2264.
- [5] E. Buszman, B. Pilawa, T. Witoszyńska, M. Latocha, T. Wilczok, Effect of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  on free radical properties of melanin from *Cladosporium cladosporioides*, Applied Magnetic Resonance 2003, 24, 401-407 (caprolactone) and the copolymers in vivo. Biomaterials (1981), 2:215-20.

## References

- [5] Haberko K., Bućko M., Haberko M., Mozgawa W., Pyda A., Zarębski J.: Hydroksyapatyt naturalny-preparatyka, właściwości. Inż. Biomat. 2003, 30,31,32,33.
- [6] M. Matuszczyk, E. Buszman, B. Pilawa, T. Witoszyńska, T. Wilczok,  $\text{Cd}^{2+}$  effect on free radicals in *Cladosporium cladosporioides*-melanin tested by EPR spectroscopy, Chemical Physics Letters 2004, 394(4-6), 366-371.
- [7] B. Pilawa, E. Buszman, A. Gondzik, S. Wilczyński, M. Zdybel, T. Witoszyńska, T. Wilczok, Effect of pH on paramagnetic centers in *Cladosporium cladosporioides*, Acta Physica Polonica A 2005, 108(1), 147-150.
- [8] E. Buszman, B. Pilawa, M. Zdybel, S. Wilczyński, A. Gondzik, T. Witoszyńska, T. Wilczok, EPR examination of  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides*, Science of The Total Environment 2006, 363(1-3), 195-205
- [9] B. Pilawa, E. Chodurek, T. Wilczok, Types of paramagnetic centres in  $\text{Cu}^{2+}$  complexes with model neuromelanins, Applied Magnetic Resonance 2003, 24, 417-422.

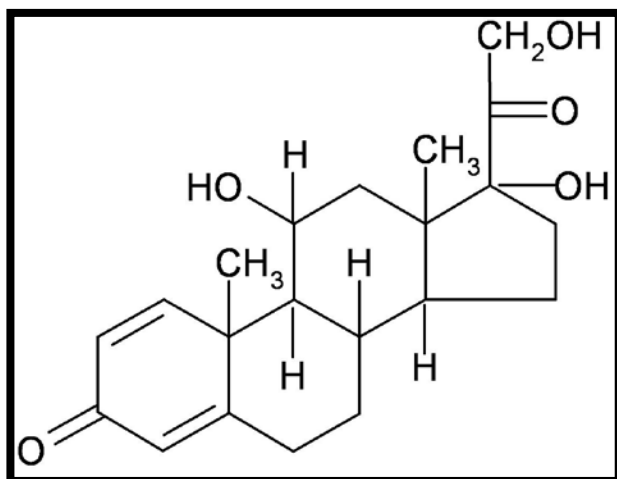
# WOLNE RODNIKI W STERYLIZOWANYM TERMICZNIE PREDNIZOLONIE

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI\*,  
BARBARA PILAWA

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
1 KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1,  
41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
2 KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, UL. JEDNOŚCI 8,  
41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

Zbadano układ wolnych rodników powstających w prednizolonie podczas sterylizacji termicznej z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) na pasmo X (9.3GHz). Celem pracy jest określenie właściwości i koncentracji wolnych rodników generowanych termicznie w prednizolonie.

Prednizolon jest glikokortykosteroidem o właściwościach przeciwzapalnych, przeciwalergicznych i immunosupresyjnych. Stanowi pochodną kortyzonu z grupy kortykosteroidów o niskiej aktywności mineralokortykoidowej. Prednizolon hamuje zapalenie i obrzęk tkanki, dlatego jest używany do leczenia zapaleń o szerokim zakresie chorób autoimmunologicznych takich jak astma, zapalenie błony naczyniowej oka, zapalenie stawów, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniewskiego-Crohn'a, stwardnienie rozsiane, toczeń rumieniowaty układowy. Jest również używany jako lek immunosupresyjny przy przeszczepie organów oraz w niektórych przypadkach niedoboru adrenaliny- choroba Addisona. Prednizolon jest lekiem steroidowy przygotowywanym również w postaci sterylnych kropli do oczu, używanych w celu redukcji obrzęku, zaczerwienienia, świądu i reakcji alergicznych oczu [1-3]. Strukturę chemiczną prednizolonu przedstawiono na RYSUNKU 1.



RYS. 1. Struktura chemiczna prednizolonu [4].  
FIG. 1. Chemical structure of prednisolone [4].

Steryлизację prowadzono w suchym powietrzu w temperaturze 180°C zgodnie. Lek ogrzewano przez 30 minut.

Widma EPR rejestrowano za pomocą spektrometru EPR Firmy RADIOPAN (Poznań) przy modulacji pola magnetycznego wynoszącej 100kHz. Wyznaczono

# FREE RADICALS IN THERMALLY STERILIZED PREDNISOLONE

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI\*,  
BARBARA PILAWA

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
1 DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
1 NARCYZOW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
2 DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
\* E-MAIL: SWILCZYNSKI@SUM.EDU.PL

Free radicals formed in prednisolone during thermal sterilization were studied by the use of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy at X-band (9.3GHz). The aim of this work was to determine properties and concentration of free radicals thermally created in prednisolone.

Prednisolone is glucocorticoids exert anti-inflammatory, anti-allergic and immunosuppressive. It's a corticosteroid drug with predominantly glucocorticoid and low mineralocorticoid activity. Prednisolone inhibit the inflammatory and the edema of the tissue, so its making useful for the treatment of a wide range of inflammatory and auto-immune conditions such as asthma, uveitis, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis and Crohn's disease, multiple sclerosis, and Systemic Lupus Erythematosus. It can also be used as an immunosuppressive drug for organ transplants and in cases of adrenal insufficiency (Addison's). Prednisolone is steroid drug prepared also as a sterile ophthalmic suspension, used to reduce swelling, redness, itching, and allergic reactions affecting the eye [1-3]. Chemical structure of prednisolone is show in FIGURE 1.

Sterilization was performer in dry air at temperature of 180°C. The drug was heated during 30 minutes.

EPR spectra were recorded by the EPR spectrometer of RADIOPAN Firm (Poznań) with modulation of magnetic field of 100kHz. Concentration of paramagnetic centers and its dependence on storage time of the sample were determined. Amplitude, integral intensity and linewidth of EPR lines were determined. Influence of microwave power on lineshape and parameters of EPR spectra were examined.

EPR lines were not observed for non-sterilized prednisolone. Stable free radicals do not exist in prednisolone which was not operated at high temperature. Free radicals in the analyzed drug are formed as the result of thermal treatment via the rupturing of chemical bonds. For thermally sterilized prednisolone EPR spectra were measured. The EPR spectra are characterized by high asymmetry, what indicates that complex free radical system exist in the studied drug (FIG. 2). Broad EPR lines were recorded what indicates on strong dipole interactions in analyzed sample. These interactions are characteristic for close located free radicals in thermally sterilized prednisolone.

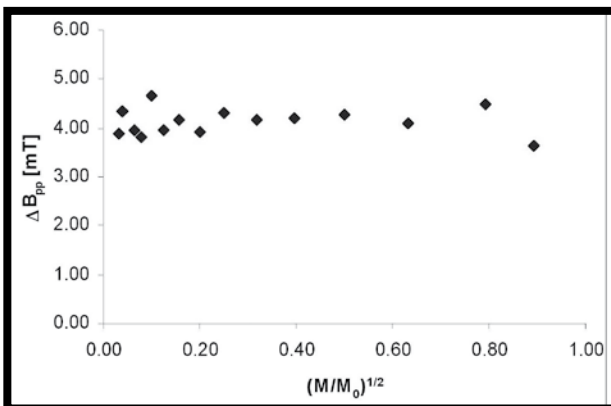
Lineshape of the EPR lines strongly depend on microwave power. Amplitude rises with microwave power increase, reaches maximum value and than decreases (FIG. 3). Only slightly influence of microwave power on EPR linewidth was observed (FIG. 4). It points that free radicals are homogenously spread in the sample – sterilizing factor acts in whole sample volume. Free radicals in prednisolone are stable and amplitude of their EPR lines decrease slowly with increasing time of storage of the sample. Slowly decrease free

koncentrację wolnych rodników oraz jej zależność od czasu przechowywania próbki. Wyznaczono amplitudę, intensywność integralną i szerokość linii EPR. Analizowano wpływ mocy mikrofalowej na kształt i parametry widm EPR.

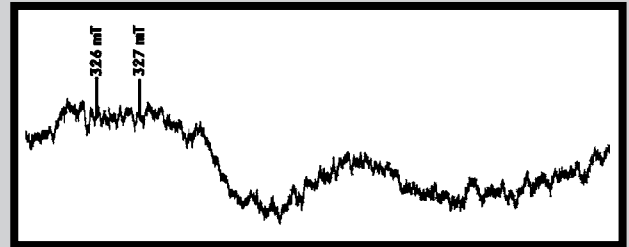
Dla prednizolonu nie poddanego sterylizacji nie rejestrowano linii EPR. W prednizolonie nie poddanym działaniu wysokiej temperatury nie występują więc trwale centra paramagnetyczne. Wolne rodniki w analizowanym leku powstają w wyniku obróbki termicznej poprzez zrywanie wiązań chemicznych. Dla prednizolonu sterylizowanego termicznie rejestrowano widma EPR. Widma EPR charakteryzuje wysoka asymetria (RYS. 2), co wskazuje na złożony układ wolnych rodników w substancji leczniczej. Zarejestrowane widmo stanowi szeroką linię EPR, co wskazuje na silne oddziaływania dipolowe w analizowanej próbce. Świadczy to o niewielkich odległościach pomiędzy wolnymi rodnikami w termicznie sterylizowanym prednizolonie.

Kształt linii EPR prednizolonu silnie zależy od mocy mikrofalowej. Amplituda linii rośnie wraz z mocą mikrofalową, osiąga wartość maksymalną po czym jej wartość maleje (RYS. 3). Szerokość linii nieznacznie zmienia się wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 4). Świadczy to o równomiernym rozmieszczeniu wolnych rodników w próbce – czynnik sterylizujący jednorodnie objął całą objętość próbki. Wolne rodniki w prednizolonie są stabilne, amplituda linii EPR wolno maleje z czasem przechowywania próbki. Niewielki spadek koncentracji wolnych rodników wraz z czasem przechowywania próbki może być związany z oddziaływaniami z paramagnetycznym tlenem atmosferycznym oraz wzajemnej rekombinacją blisko siebie położonych termicznie wzbudzonych wolnych rodników.

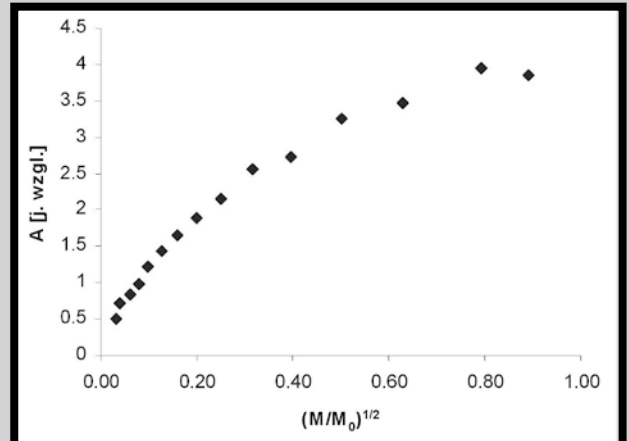
[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 61-62]



**RYS. 4.** Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość  $\Delta B_{pp}$  termicznie sterylizowanego Prednizolonu.  
**FIG. 4.** Influence of microwave power on EPR line-widths  $\Delta B_{pp}$  in thermally sterilized prednisolone.



**RYS. 2.** Widmo EPR termicznie sterylizowanego prednizolonu rejestrowane przy tłumieniu 15dB.  
**FIG. 2.** EPR spectra of thermally sterilized prednisolone recorded with 15dB microwave power attenuation.



**RYS. 3.** Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A linii termicznie sterylizowanego prednizolonu.  
**FIG. 3.** Influence of microwave power on EPR line amplitude in thermally sterilized prednisolone.

radical concentration with time increasing during sample storage is probably related with atmospheric paramagnetic oxygen interactions and close situated thermal generated free radicals recombination.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 61-62]

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlewska A., Leki współczesnej terapii, Split Tranding, Warszawa, 2008.
- [2] PHARMINDEX Kompendium Leków, CMP Medica United Business Media, 2008.
- [3] Ostanek. L., Bobrowska- Snarska D., Brzosko M., The safety of phamacotherapy of rheumatic diseases in gestation and lactation, Reumatologia 2006, 44, 6: 324-329.
- [4] Zejc A., Gorczyca M., Chemia leków, PZWL, Warszawa 2002.

## OCENA KONCENTRACJI, TRWAŁOŚCI I TYPU WOLNYCH RODNIKÓW POWSTAJĄCYCH W TRAMADOLU POD WPŁYWEM WYSOKIEJ TEMPERATURY

BARBARA PILAWA, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, PAWEŁ RAMOS, ANNA TOMASIK

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH,  
<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFARMACJI, UL. NARCYZÓW 1,  
 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI, UL. JEDNOŚCI 8,  
 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

*Wpływ wysokiej temperatury na substancje biologicznie czynne jest szczególnie istotny w kontekście termicznej sterylizacji leków. Wysoka temperatura, zabójcza dla mikroorganizmów, może powodować zrywanie się wiązań chemicznych a co za tym idzie powstawanie produktów rozpadu. Wśród produktów rozpadu powstających pod wpływem działania wysokiej temperatury w substancjach leczniczych szczególnie miejsce zajmują wolne rodniki. Ich wyjątkowa pozycja wynika z faktu, iż nawet niewielkie koncentracje wolnych rodników mogą powodować niebezpieczne następstwa podczas farmakoterapii zanieczyszczonymi substancjami leczniczymi. Ważny jest fakt, że wolne rodniki mogą negatywnie wpływać na pacjenta nawet w bardzo niewielkich stężeniach. Dotyczy to zwłaszcza leków podawanych parenteralnie, między innymi tramadolu.*

*Tramadol jest syntetycznym lekiem przeciwbólowym o opioidowym i nieopioidowym mechanizmie działania [1-2].*

*Metodą, która pozwala na ilościowe oraz jakościowe pomiary wolnych rodników w termicznie sterylizowanych lekach jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR. Sterylizację termiczną tramadolu wykonano w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 180°C. Czas sterylizacji wynosił 30 minut. Próbkę miały postać sproszkowaną. Pomiary EPR wykonano za pomocą spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) produkcji RADIOPAN - Poznań. Zastosowano modulację pola magnetycznego wynoszącą 100kHz. Częstotliwość promieniowania mikrofalowego rejestrowano miernikiem MCM 101 produkcji RADIOPAN - Poznań.*

*Widma EPR rejestrowano w postaci pierwszej pochodnej absorpcji przy wysokim tłumieniu 15dB, aby uniknąć nasycenia mikrofalowego linii. Całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez kłistron wynosiła około 2.2mW. Wyznaczono następujące parametry widm EPR: amplitudę linii, szerokość linii oraz współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g. Określono również koncentrację wolnych rodników oraz ich stabilność. Wzorcem zewnętrznym służącym wyznaczeniu koncentracji wolnych rodników w termicznie sterylizowanym tramadolu była ultramarina. Natomiast wzorcem pomocniczym na trwale umieszczonym we wnęce rezonansowej był kryształ rubinu. Określono także wpływ mocy mikrofalowej na podstawowe parametry widm EPR – amplitudę i szerokość linii EPR.*

## EVALUATION OF CONCENTRATION, STABILITY AND TYPES OF FREE RADICALS GENERATED IN TRAMADOLE EXPOSED TO HIGH TEMPERATURE

BARBARA PILAWA, SŁAWOMIR WILCZYŃSKI, PAWEŁ RAMOS, ANNA TOMASIK

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHARMACY,  
 1 NARCYZOW STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND  
<sup>2</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
 8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

*Influence of high temperature on biologic active substances is particularly important in context of thermally sterilized drugs. High temperature, lethal for microorganisms, can cause cleavage of chemical bonds and consequent degradation products forming. Among degradation products formed under the influence of high temperature, free radicals are particularly important. Its special status result from fact that even very few free radicals concentrations can cause dangerous sequences during contaminated substances pharmacotherapy. It is important that free radicals even in very few concentrations can have negative influence on patients. It concerns especially parenterally administrated drugs, inter alia tramadole.*

*Tramadole is a synthetic drug that acts analgesic with opioid and non-opioid effect [1,2].*

*EPR spectroscopy brings information about types and amount of free radicals in thermally sterilized drugs. Thermal sterilization of tramadole was performed in hot air oven with air circulating at 180°C. Sterilization was performed during 30 minutes. Powdered samples were analyzed. Measurements of EPR spectra were done by the use of EPR spectrometer produced by RADIOPAN Firm (Poznań). Modulation of magnetic field of 100kHz was applied. Microwave frequency was evaluated using MCM 101 frequency recorder produced by RADIOPAN - Poznań. The first-derivative EPR spectra were recorded with high microwave power attenuation 15dB to avoid the microwave saturation. Total microwave power produced by klystron was about 2.2mW. The following EPR parameters were determined: amplitude, linewidth and g-factor. Free radicals concentration and stability were also evaluated. Ultramarine was used as reference of paramagnetic centers concentration. A ruby crystal, permanently placed in resonance cavity, was the second reference. Influence of microwave power on basic EPR parameters: amplitude and linewidth of EPR lines were tested.*

*For not heated tramadole EPR spectra were not observed. It indicates absence of stabile paramagnetic centers in initial substance. EPR spectra of the studied drug sterilized at 180°C have asymmetric, broad lines what indicates strong spin-spin magnetic interactions in thermally sterilized tramadole. These interactions causing broadening EPR lines and are characteristic for close located free radicals in molecular structure of the drug.*

Dla tramadolu nie poddanego obróbce termicznej, nie obserwowano widm EPR. Oznacza to, że w badanej substancji leczniczej nie występują trwałe centra paramagnetyczne.

Widma EPR badanego leku sterylizowanego w temperaturze 180°C stanowią asymetryczne szerokie linie (RYS. 1), co wskazuje na silne oddziaływania magnetyczne spin-spin w sterylizowanym termicznie tramadolu. Oddziaływania te poszerzają linie EPR i są charakterystyczne dla wolnych rodników położonych blisko siebie w strukturze molekularnej leku.



RYS. 1. Widmo EPR tramadolu rejestrowane przy tłumieniu 15 dB w dniu sterylizacji termicznej w temperaturze 180°C. B – indukcja pola magnetycznego.

FIG. 1. EPR spectrum of tramadol recorded at 15dB microwave power attenuation in the day of sterilization at 180°C temperature. B – magnetic field induction.

Zarejestrowano wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę i szerokość linii EPR. Taki charakter zmian (RYS. 2) wskazuje, że wolne rodniki w termicznie sterylizowanym tramadolu są rozmieszczone jednorodnie w całej objętości próbki. Zaobserwowano wpływ czasu przechowywania na koncentrację wolnych rodników (proporcjonalną do wartości amplitudy linii EPR) w termicznie sterylizowanym tramadolu (RYS. 3). Ilość wolnych rodników maleje w kolejnych dniach pomiarowych. Zjawisko to może być związane z procesami rekombinacji pomiędzy blisko siebie położonymi wolnymi rodnikami oraz interakcji z paramagnetycznym tlenem atmosferycznym.

Nie zaobserwowano wpływu czasu przechowywania na szerokość linii EPR tramadolu.

Wyznaczono współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$  świadczący o typie wolnych rodników znajdujących się w próbce. Otrzymany wynik  $g=0,0027$  sugeruje, że niesparowane elektrony zlokalizowane są na atomach tlenu. Nie zaobserwowano wpływu czasu przechowywania na średni współczynnik rozszczepienia spektroskopowego  $g$ .

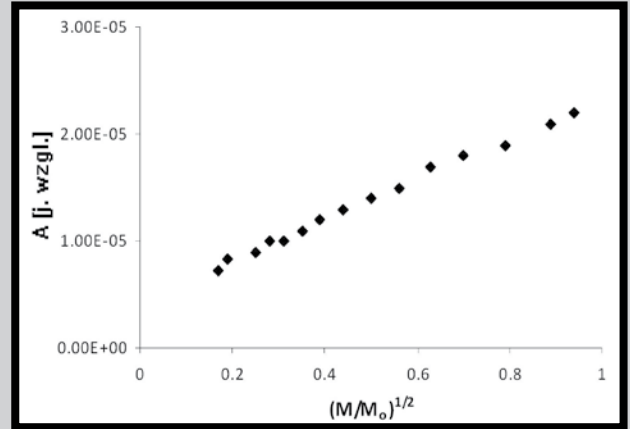
Wszystkie przedstawione dane wskazują, że wysoka temperatura (180°C) powoduje generowanie się dużej ilości wolnych rodników. Asymetryczne, złożone linie EPR wskazują na istnienie kilku typów wolnych rodników w tramadolu poddanemu obróbce termicznej. Poszerzenie dipolowe linii EPR sugerują niewielkie odległości pomiędzy wolnymi rodnikami. Nasylenie mikrofalowe widm EPR wskazuje na jednorodne rozmieszczenie wolnych rodników w sterylizowanym termicznie tramadolu. Wraz z czasem przechowywania koncentracja wolnych rodników maleje.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 63-64]

## Piśmiennictwo

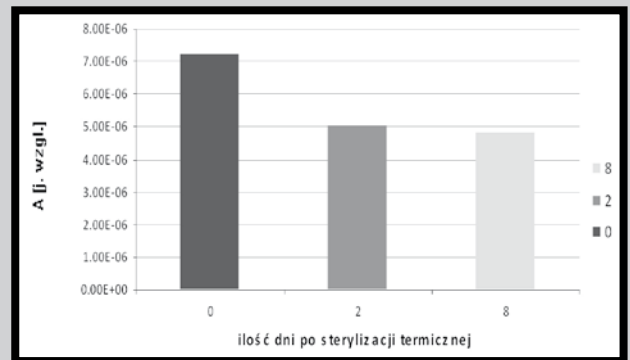
- [1] Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podlewska A., Leki współczesnej terapii, Split Trading, Warszawa, 2008.  
[2] Zejc A., Gorczyca M., Chemia leków, PZWL, Warszawa 2002.

## References



RYS. 2. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę A linii EPR sterylizowanego tramadolu.

FIG. 2. Influence of microwave power on amplitude A in sterilized tramadol.



RYS. 3. Wpływ czasu przechowywania na koncentrację wolnych rodników w termicznie sterylizowanym tramadolu.

FIG. 3. Influence of storage time on free radicals concentration in thermally sterilized tramadol.

Influence of microwave power on EPR line amplitude was observed. This kind of relationship indicates that free radicals in thermally sterilized tramadol are homogeneously located in whole sample volume. Influence of sample storage on free radicals concentration (proportionally to amplitude value) was observed. This phenomenon can be related with recombination processes between close located to each other free radicals and interactions with paramagnetic oxygen molecules.

Influence of time of storage on EPR linewidths was not observed.  $g$ -factor, free radical type determining, was evaluate. Determined result  $g=2.0027$ , suggest that unpaired electrons are located on oxygen atoms. Influence of time of storage on average  $g$ -factor value was not observed. All presented data point that high temperature (180°C) cause big amount of free radicals creating. Asymmetric, complex EPR lines indicate on few types of free radicals existing in tramadol expose to high temperature. Dipole boarded EPR lines suggest little distance between free radicals. Microwave saturation of EPR lines indicates homogeneous distribution of free radicals in thermally sterilized tramadol. Free radicals concentration decrease with increasing time of storage.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 63-64]

# MODELOWE BADANIA EPR WPŁYWU STĘŻENIA LEKU NA WŁAŚCIWOŚCI CENTRÓW PARAMAGNETYCZNYCH W KOMPLEKSACH BIOPOLIMERU MELANINOWEGO Z NETILMICYNĄ

BARBARA PILAWA<sup>1\*</sup>, MAGDALENA ZDYBEL<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, JOANNA MROCHEN<sup>1</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ  
FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ,

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,

UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC

\* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Melanina jest ciemnym pigmentem powszechnie występującym w organizmach roślinnych i zwierzęcych. U człowieka występuje w skórze, włosach, oczach, uchu wewnętrznym, ośrodkowym układzie nerwowym [1,2]. W organizmach żywych występuje głównie wybrana do badań eumelanina (RYS. 1). Jest to grupa melanin o zabarwieniu brązowo-czarnym [1,2]. Kolejną grupę stanowią feomelaniny o barwie czerwono-brązowej, które zawierają siarkę oraz alomelaniny [1,2].

Melanina to biopolimer wykazujący wysokie powinowactwo do jonów metali oraz substancji leczniczych [1-4]. Długotrwała ekspozycja lub wysokodawkowa terapia substancjami leczniczymi może prowadzić do nadmiernej kumulacji tych substancji w melaninie, a w konsekwencji do degradacji upigmentowanych tkanek [3,4].

Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu stężenia leku na koncentrację i właściwości centrów paramagnetycznych występujących w kompleksach DOPA-melaniny – eumelaniny z przykładowym antybiotykem – netilmicyną.

Widma EPR kompleksów DOPA-melanina-netilmicyna mierzono z wykorzystaniem spektrometru elektronowego rezonansu paramagnetycznego na pasmo X (9.3GHz) w temperaturze pokojowej w szerokim zakresie mocy mikrofalowej wynoszącym 0.7-70mW. Zastosowano następujące stężenia netilmicyny w analizowanych kompleksach:  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M oraz  $1 \times 10^{-2}$  M. Wyznaczono koncentrację centrów paramagnetycznych, współczynnik rozszczepienia spektroskopowego g, amplitudę i szerokość linii EPR. Zbadano wpływ mocy mikrofalowej na nasycenie mikrofalowe widm EPR kompleksów melaninowych.

Wszystkie badane kompleksy melaninowe charakteryzuje wysoka koncentracja centrów paramagnetycznych z zakresu  $1.6-2.2 \times 10^{19}$  spin/g. Koncentracja centrów paramagnetycznych w kompleksach DOPA-melanina-netilmicyna zależy od stężenia leku. Najmniejsza wartość koncentracji centrów paramagnetycznych otrzymano w przypadku kompleksów o stężeniu netilmicyny  $5 \times 10^{-4}$  M.

# MODEL EPR STUDIES OF INFLUENCE OF DRUG CONCENTRATION ON PROPERTIES OF PARAMAGNETIC CENTRES IN COMPLEXES OF MELANIN BIOPOLYMER WITH NETILMICIN

BARBARA PILAWA<sup>1\*</sup>, MAGDALENA ZDYBEL<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>,  
DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, JOANNA MROCHEN<sup>1</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY,

4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

\* E-MAIL: BPILAWA@SUM.EDU.PL

Melanin is a pigment in the plants or animals. In humans, melanin biopolymer is found in skin, hair, the iris, inner ear and nervous system [1,2].

The most common form of biological melanin is eumelanin (FIG. 1). It is a brown-black polymer. Another common form of melanin is pheomelanin. It is a red-brown polymer [1,2].

Melanin can bind medical drugs and metal ions [1-4]. Interactions of high doses of drugs with melanins may be responsible for many toxic effects in pigmented tissues, e.g. toxic retinopathy, hyperpigmentation of the skin, hair bleaching and some ocular and inner ear lesions [3,4].

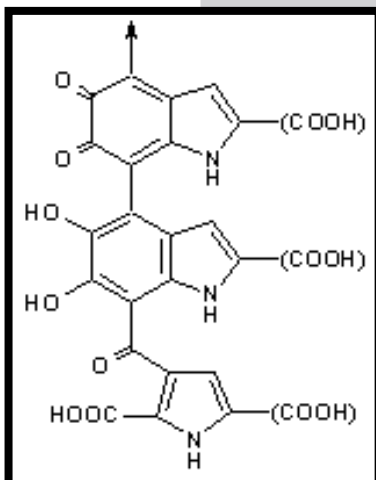
The aim of this work was to determine influence of drug concentration on the amount and properties of paramagnetic centres existing in complexes of DOPA-melanin – eumelanin with exemplary antibiotic – netilmicin.

EPR spectra of DOPA-melanin-netilmicin complexes were measured by the use of an X-band (9.3GHz) electron paramagnetic resonance spectrometer at room temperature in the wide range of microwave power (0.7-70mW). The following concentrations of netilmicin in the analyzed complexes were applied:  $1 \times 10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M and  $1 \times 10^{-2}$  M. Paramagnetic centres concentration, g-factor, amplitude and linewidth of EPR spectra were evaluated. We determined the effect of continuous microwave saturation on melanins EPR spectra.

All the studied melanins complexes characterized high paramagnetic centres concentrations  $1.6-2.2 \times 10^{19}$  spin/g. The concentrations of paramagnetic centres in DOPA-melanin-netilmicin complexes depend on drug concentration. The lowest paramagnetic centres concentration was obtained for complexes with netilmicin concentration of  $5 \times 10^{-4}$  M.

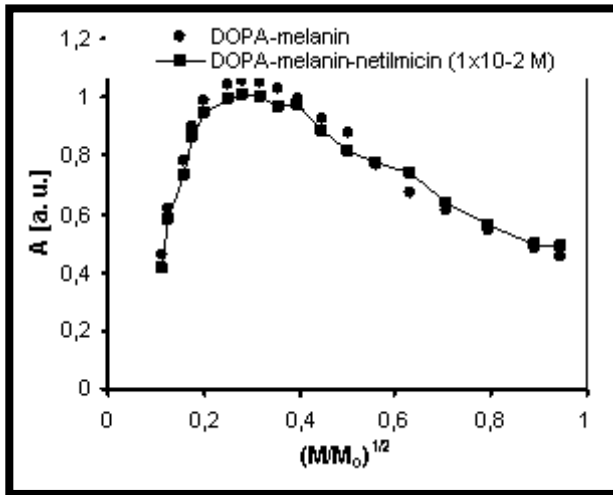
The measured EPR spectra were broad asymmetrical lines with linewidths in the range 0.45-0.48mT. g-Factor of 2.0043 characteristic for o-semiquinone free radicals was obtained for the samples.

Changes of amplitude and linewidths of EPR lines of DOPA-melanin and the exemplary DOPA-melanin-netilmicin complex with increasing of



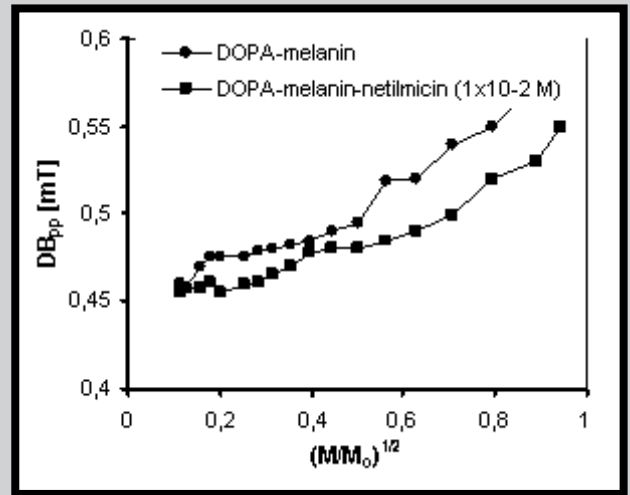
RYS. 1. Struktura chemiczna eumelaniny [2].  
FIG. 1. Chemical structure of eumelanin [2].





**RYS. 2.** Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z netilmiciną. Stężenie czynnika kompleksującego wynosiło  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_0$  – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

**FIG. 2.** Influence of microwave power on amplitudes (A) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin and DOPA-melanin complex with netilmicin. Concentration of complexing agent was  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_0$  – total microwave power produced by klystron. M – microwave power used during the measurement.



**RYS. 3.** Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z netilmiciną. Stężenie czynnika kompleksującego wynosiło  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_0$  – całkowita moc mikrofalowa wytwarzana przez klystron. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

**FIG. 3.** Influence of microwave power on line-widths ( $\Delta B_{pp}$ ) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin and DOPA-melanin complex with netilmicin. Concentration of complexing agent was  $1 \times 10^{-2} M$ .  $M_0$  – total microwave power produced by klystron. M – microwave power used during the measurement.

Rejestrowane widma EPR stanowiły szerokie asymetryczne linie o wartościach szerokości sygnału z zakresu 0.45-0.48 mT. Dla wszystkich próbek otrzymano wartość współczynnika  $g=2.0043$  charakterystyczną dla o-semichinonowych wolnych rodników.

Zmiany amplitudy i szerokości linii EPR wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej dla DOPA-melaniny oraz przykładowego kompleksu DOPA-melanina-netilmicina pokazano odpowiednio na RYSUNKACH 2 i 3. Stwierdzono spadek amplitudy dla wyższych mocy mikrofalowych (RYS. 2). Szerokość linii EPR rośnie wraz ze wzrostem mocy mikrofalowej (RYS. 3). Korelacje przedstawione na RYSUNKACH 2 i 3 wskazują na jednorodne poszerzenie linii EPR [4-6]. Podobne korelacje otrzymano dla wszystkich badanych kompleksów.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 65-66]

microwave power are compared in FIGURES 2 and 3, respectively. Decrease of amplitudes for the higher microwave powers were observed (FIG. 2). Linewidths increase with increasing of microwave power (FIG. 3). Correlations presented in FIGURES 2 and 3 indicate that the EPR spectra are homogeneously broadened [4-6]. Similar correlations were obtained for all the examined complexes.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 65-66]

## Piśmiennictwo

- [1] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad Biof Współ 1981; 6: 201-219.
- [2] Wakamatsu K, Ito S. Advanced chemical methods in melanin determination. Pigment Cell Res 2002; 15: 174-183.
- [3] Pilawa B, Buszman E, Wrześniok D, Latocha M, Wilczok T. Application of EPR spectroscopy to examination of gentamicin and kanamycin binding to DOPA-melanin. Appl Magn Reson 2002; 23: 181-192.

## References

- [4] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, Wrześniok D, Grzegorzczak A, Wilczok T. EPR examination of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes. Chem Phys Letters 2005; 403: 22-28.
- [5] Wertz JE, Bolton JR. Electron spin resonance. Elementary theory and practical applications. New York: Academic Press; 1986.
- [6] Stankowski J, Hilczer W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Warszawa: PWN; 2005.

# BADANIA EPR ODDZIAŁYWAŃ SPIN-SIEĆ W KOMPLEKSACH MODELOWEJ EUMELANINY Z NETILMICYNĄ I JONAMI Cu(II)

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>, DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, RYSZARD KRZYMIŃSKI<sup>3</sup>, ZDZISŁAW KRUCZYŃSKI<sup>3</sup>

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ,

<sup>1</sup>KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,

UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA

<sup>2</sup>KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII I ANALIZY LEKÓW,

UL. JAGIELLOŃSKA 4, 41-200 SOSNOWIEC

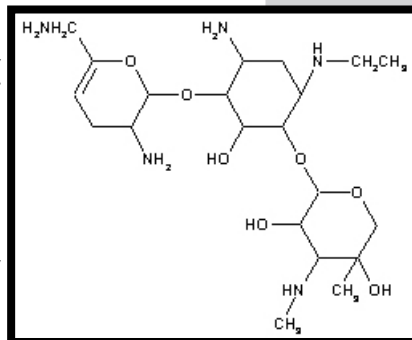
<sup>3</sup>UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA,

WYDZIAŁ FIZYKI, ZAKŁAD FIZYKI MEDYCZNEJ,

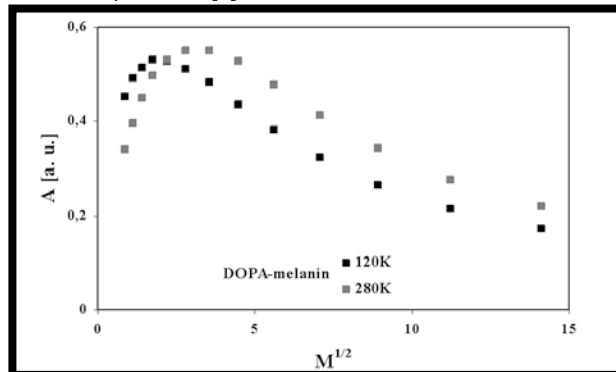
UL. UMULTOWSKA 85, 61- 614 POZNAŃ

\* E-MAIL: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

Przeprowadzono badania modelowej eumelaniny – DOPA-malaniny oraz jej kompleksów z netilmicyną i jonami Cu(II) z zastosowaniem spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Eumelanina jest paramagnetycznym biopolimerem najczęściej występującym w organizmie ludzkim, u zwierząt i w świecie roślinnym [1,2]. Znajomość oddziaływań magnetycznych w polimerach melaninowych jest istotna dla rozwoju inżynierii biomateriałów. Centra paramagnetyczne melanin mogą powodować efekty toksyczne w tkankach oraz reakcje wolnorodnikowe z implantami [1].



RYS. 1. Struktura chemiczna netilmicyny [3].  
FIG. 1. Chemical structure of netilmicin [3].



RYS. 2. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR DOPA-melaniny. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG. 2. Influence of microwave power on amplitudes (A) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin. M – microwave power used during the measurement.

Netilmicyna to antybiotyk należący do grupy aminoglikozydów [3]. Jest to półsyntetyczna pochodna sisomicyny (RYS. 1), stosowana w zakażeniach wywołanych przez bakterie Gram-ujemne [3]. Z ogólnie stosowanych antybiotyków aminoglikozydowych netilmicyna uważana jest za najmniej nefrotoksyczną oraz ototoksyczną, a jednocześnie o najsilniejszym działaniu bakterijskim [3]. Podobnie jak inne antybiotyki aminoglikozydowe nie wchłania się z przewodu pokarmowego, w związku z powyższym stosowana jest do-

# EPR STUDIES OF SPIN-LATTICE INTERACTIONS IN MODEL EUMELANIN COMPLEXES WITH NETILMICIN AND Cu(II)

MAGDALENA ZDYBEL<sup>1\*</sup>, BARBARA PILAWA<sup>1</sup>, EWA BUSZMAN<sup>2</sup>, DOROTA WRZEŚNIOK<sup>2</sup>, RYSZARD KRZYMIŃSKI<sup>3</sup>, ZDZISŁAW KRUCZYŃSKI<sup>3</sup>

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,

SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND,

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY,

4 JAGIELLOŃSKA STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND

<sup>3</sup>ADAM MICKIEWICZ UNIVERSITY,

FACULTY OF PHYSICS, DIVISION OF MEDICAL PHYSICS

85 UMULTOWSKA STR., 61- 614 POZNAŃ, POLAND

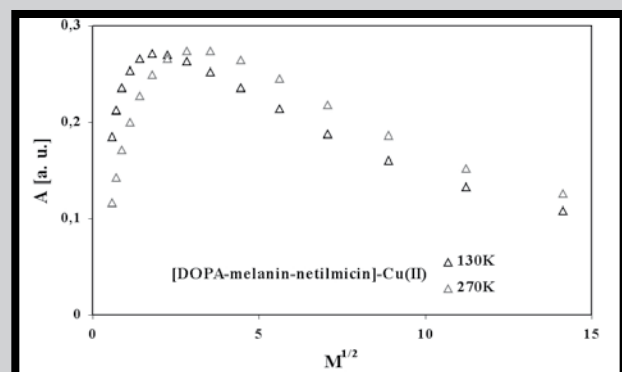
\* E-MAIL: MZDYBEL@SUM.EDU.PL

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopic studies of model eumelanin – DOPA-melanin and its complexes with netilmicin and Cu(II) ions were performed. Eumelanin is the paramagnetic biopolymer which exist in living organisms, tissues and plants [1-2]. Knowledge about magnetic interactions in melanin polymer is important to develop of biomaterials engineering. Paramagnetic centers of melanin may be responsible for toxic effects in tissues and for free radical reactions with implants [1].

Netilmicin is a member of aminoglycoside antibiotics. It is a semisynthetic aminoglycoside analog of sisomicin (FIG. 1) [3]. Netilmicin is active against a wide variety of aerobic gram-negative bacteria [3]. These antibiotics is characterized by lowest toxicity of this aminoglycoside

antibiotic and high practical applications [3].

Netilmicin is only given by injection or infusion. It is used in the treatment of serious infections: sepsis, infections of the respiratory and urinary tract [3].



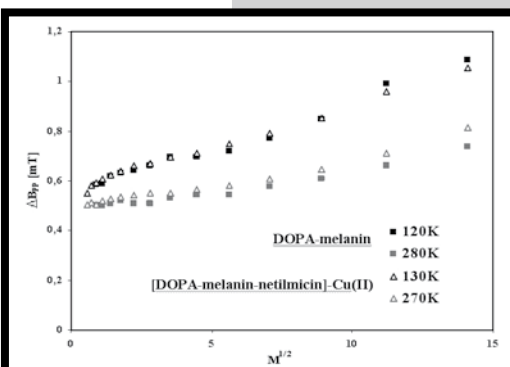
RYS. 3. Wpływ mocy mikrofalowej na amplitudę (A) linii EPR kompleksu DOPA-melaniny z netilmicyną i jonami Cu(II). Stężenie czynników kompleksujących wynosiło 1x10<sup>-3</sup> M. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG. 3. Influence of microwave power on amplitudes (A) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin complex with netilmicin and Cu(II). Concentrations of complexing agents were 1x10<sup>-3</sup>M. M – microwave power used during the measurement.

zylmie lub domięśniowo. Wskazaniemi do stosowania netilmicyny są m.in.: sepsa, zakażenia dróg moczowych, zakażenia dróg oddechowych [3].

Celem niniejszej pracy jest zbadanie oddziaływań spin-sieć w kompleksach DOPA-melaniny z netilmicyną oraz jonami Cu(II). Szybkość oddziaływań spin-sieć zależy od struktury biopolimeru melaninowego [4-7]. Struktura molekularna oraz właściwości paramagnetyczne biopolimeru melaninowego są modyfikowane przez stosowany antybiotyk – netilmicynę i jony metalu [5]. W analizowanych próbkach melaninowych zachodzą wolne procesy relaksacji spin-sieć, a ich szybkość maleje ze spadkiem temperatury (RYS. 2-3). Nasylenie mikrofalowe linii EPR wykazało, że centra paramagnetyczne w melaninie oraz w testowanych kompleksach są rozmieszczone jednorodnie (RYS. 2-4).

[Inżynieria Biomateriałów,  
81-84, (2008), 67-68]



RYS. 4. Wpływ mocy mikrofalowej na szerokość ( $\Delta B_{pp}$ ) linii EPR DOPA-melaniny oraz jej kompleksu z netilmicyną i jonami Cu(II). Stężenie czynników kompleksujących wynosiło  $1 \times 10^{-3}$  M. M – moc mikrofalowa stosowana podczas pomiaru widma EPR.

FIG. 4. Influence of microwave power on linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) of free radicals EPR spectra of DOPA-melanin and DOPA-melanin complex with netilmicin and Cu(II). Concentrations of complexing agents were  $1 \times 10^{-3}$  M. M – microwave power used during the measurement.

The aim of this work is to examine spin-lattice interactions in DOPA-melanin complexes with netilmicin and Cu(II) ions. Spin-lattice relaxation time depends on chemical structure of melanin biopolymer [4-7]. Molecular structure and paramagnetic properties of melanin biopolymer are modified by the used antibiotic – netilmicin and metal ions presented in tissues [5]. It was stated that slow spin-lattice relaxation processes exist in melanin samples, and time of spin-lattice relaxation increase with decreasing of temperature (FIG. 2-3). Microwave saturation of EPR lines indicate that paramagnetic centers in melanin and in the tested complexes are homogeneously distributed (FIG. 2-4).

[Engineering of Biomaterials,  
81-84, (2008), 67-68]

## Piśmiennictwo

- [1] Sarna T. Badanie struktury i właściwości centrów aktywnych melanin. Zagad Biof Współ 1981; 6: 201-219.  
[2] Krzywda A, Petelenz E, Michalczyk D, Płonka PM. Sclerotia of the acellular (true) slime mould Fuligo septica as a model to study melanization and anabiosis. Cell Mol Biol Let 2008; 13: 130-143.  
[3] Zejc A, Gorczyca M, red. Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów. Warszawa: PZWL; 2002.  
[4] Sealy RC, Hyde JS, Felix CC, Menon IA, Prota G. Eumelanins and pheomelanins: characterization by electron spin resonance spectroscopy. Science 1982; 217: 545-547.

## References

- [5] Buszman E, Pilawa B, Zdybel M, Wrześniok D, Grzegorzczak A, Wilczok T. EPR examination of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> effect on free radicals in DOPA-melanin-netilmicin complexes. Chem Phys Letters 2005; 403: 22-28.  
[6] Wertz JE, Bolton JR. Electron spin resonance. Elementary theory and practical applications. New York: Academic Press; 1986.  
[7] Stankowski J, Hilczner W. Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych. Warszawa: PWN; 2005.

## ODDZIAŁYWANIA BIOFIZYCZNE FOTOU CZULACZY STOSOWANYCH W DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, JAKUB ADAMCZYK, BARBARA PILAWA

ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY LABORATORYJNEJ, KATEDRA I ZAKŁAD BIOFIZYKI,  
UL. JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLSKA  
E-MAIL: MEGDY@INTERIA.PL

Wykorzystywanie światła wraz z substancją fotouczulającą w terapii medycznej jest znane od dawna, a obecnie rozwijana jest również diagnostyka fotodynamiczna (PDD). Diagnostyka fotodynamiczna jest metodą nieinwazyjną stosowaną w diagnozowaniu wielu rodzajów nowotworów, takich jak: rak podstawonokomórkowy, rak kolczystokomórkowy, rak płuc, nowotwory złośliwe mózgu [1-2]. Podstawą w diagnozowaniu

## BIOPHYSICAL INTERACTIONS OF PHOTOSENSITIZERS APPLIED IN PHOTODYNAMIC DIAGNOSIS

MAGDALENA KOŚCIELNIAK, JAKUB ADAMCZYK, BARBARA PILAWA

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA IN KATOWICE,  
SCHOOL OF PHARMACY AND LABORATORY MEDICINE,  
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,  
8 JEDNOŚCI STR., 41-200 SOSNOWIEC, POLAND,  
E-MAIL: MEGDY@INTERIA.PL

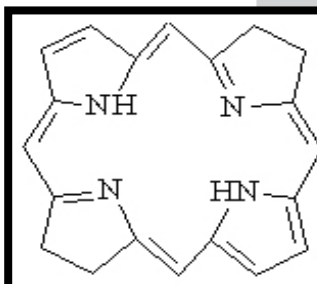
Application of light and photosensitizers molecules in medicinal therapy and diagnosis (PDD) is known. Photodynamic diagnosis is used for a lot of tumors, for example: basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, pulmonary carcinoma, malignant neoplasm of the brain. The main problem of PDD is to choose of the optimal photosensitizer. Effective photodynamic processes depend on chemical structure, and chemical and physical properties of photosensitizers [1-10].

tkanek patologicznie zmienionych przy zastosowaniu PDD jest dobranie odpowiedniego fotouczulacza. Właściwości fotouczulające, czyli cytotoksyczne zależą przede wszystkim od struktury chemicznej fotouczulacza, jego właściwości fizycznych i chemicznych, zdolności wnikania i akumulacji w tkance wykazującej zmiany patologiczne [1-6]. Praca niniejsza stanowi przegląd literaturowy dotyczący właściwości fizykochemicznych oraz oddziaływań biofizycznych fotosensybilizatorów z tkanką w procesie diagnostycznym.

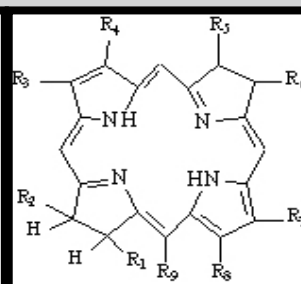
Najczęściej stosowanymi fotouczulaczami w diagnostyce medycznej są pochodne porfiryny (RYS. 1) [5]. Wyróżniamy trzy klasy fotouczulaczy: hydrofobowe, hydrofilowe i amfilowe [7]. W pracy niniejszej przedstawione będą właściwości i oddziaływania biofizyczne pochodnych szeregu chlorinu (chlorinu e6 [8], (RYS. 2)). Omówione będą oddziaływania i właściwości fotouczulaczy z grupy ftalocyjaniny (Pc), naftocyjaniny (Npc) oraz ich metaliczne pochodne Zn, Al, Ga, Si, Sn (RYS. 3) [9]. Szczególną uwagę zwrócono na właściwości kwasu 5-aminolewulinowego (ALA), który jest pięciowęglowym aminokwasem (RYS. 4) [5, 10, 11].

Podczas diagnostyki fotodynamicznej fotouczulacz naświetlany promieniowaniem laserowym o odpowiednio dobranej długości fali przechodząc na niższe poziomy energetyczne oddaje energię strukturom tkanek, co prowadzi do generowania wolnych rodników oraz wzbudzenia molekuł tlenu z paramagnetycznego stanu podstawowego do singletowego stanu diamagnetycznego. Wolne rodniki oraz tlen singletowy mogą powodować efekty toksyczne w tkankach. Efekty te zależą od ilości i rodzajów wytwarzanych wolnych rodników oraz od koncentracji tlenu singletowego, a więc od rodzaju stosowanego fotouczulacza i warunków procesów fotodynamicznych.

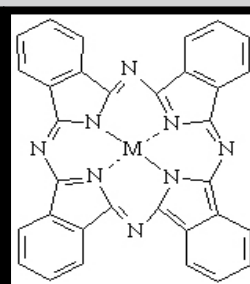
[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 68-69]



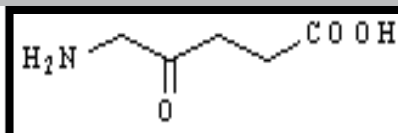
RYS. 1. Budowa chemiczna porfiryny [5].  
FIG. 1. Chemical structure of porphyrin [5].



RYS. 2. Budowa chemiczna chlorinu e6 [8].  
FIG. 2. Chemical structure of chlorine e6 [8].



RYS. 3. Budowa chemiczna metaloftalocyjanin [9].  
FIG. 3. Chemical structure of metallophthalocyanine [9].



RYS. 4. Budowa chemiczna kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) [11].  
FIG. 4. Chemical structure of 5-aminolevulinic acid [11].

This work is the review of physicochemical properties and biophysical interactions of photosensitizers with tissues during photodynamic diagnosis.

Derivatives of porphyrins (FIG. 1) [5], chlorine e6 (FIG. 2) [8], metallophthalocyanines compounds

(FIG. 3) [9], and 5-aminolevulinic acid [11], were discussed.

During photodynamic diagnostic processes the excited photosensitizer irradiated by laser causes excitation of oxygen molecules from paramagnetic ground state to diamagnetic singlet state. These effects are accompanied by formation of free radicals and reactive singlet oxygen, which damages cells structures. Free radicals and singlet oxygen may be responsible for toxic effects in tissues during PDD. These interactions depend on amount and types of free radicals and depend on concentration of singlet oxygen, so we can say that type of applied photosensitizer and photodynamic conditions determine negative reactions during photodynamic diagnosis.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 68-69]

## Piśmiennictwo

- [1] Mackiewicz-Wysocka M. Photodynamic therapy- current indications and effectiveness in particular premalignant and malignant skin diseases. *Post Dermatol Alergol* 2007;XXIV,3:127-132.
- [2] Bednarkiewicz A., Stręk W. Fotodynamiczna terapia i diagnostyka nowotworów- źródła światła, dyfuzory, dozymetria. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. 2002; 8: 205-213.
- [3] Pazurek M., Malecka- Panas E. Zastosowanie terapii fotodynamicznej w paliatywnym leczeniu raka przełyku i wpuustu. *Przeegl Gastroenterol* 2006; 1,2: 1-5-109.
- [4] Ion R. M. Photodynamic therapy: a new concept and clinical reality for medicine. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. 2006; 12: 37- 49.
- [5] Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004; 1: 27- 42.
- [6] Tamošūnas M., Bagdonas S., Didžiapetrienė J., Rotomski R. Electroporation of transplantable tumors for the enhanced accumulation of photosensitizers. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. 2006; 12: 57-59

## References

- [7] Kwietniewski M., Kunikowska D., Dera-Tomaszewska B., i wsp. Influence of tiamino acid derivatives of protoporphyrin IX on Mouse immunological system: Preliminary results. *J Photochem Photobiol B*. 2005; 81: 129-135.
- [8] Zharvid E.A., Chodina T.B., Zhuravkin I.N., Kotshubeev G.A., Grubina L.A., Plenina L.V. Wstępne badania kliniczne zastosowania chlorinu e6 w terapii fotodynamicznej. *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*. 2002; 8: 35-43.
- [9] Magaraggia M., Visona A., Furlan A., i wsp. Inactivation of vascular smooth muscle cells photosensitized by liposome-delivered Zn(II)-phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B*. 2006; 82: 53-58
- [10] Wild P.J., Krieg R.C., Seidl J. RNA expression profiling of normal and tumor cells following photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *In vitro*. *J. Clin. Oncol*. 2006; 24(23): 3719- 3721.
- [11] Bednarkiewicz A., Ziółkowski P., Osiecka B.J., i wsp. Photodynamic diagnostic of skin tumors by the use of 5-aminolevulinic acid and digital image recording and analysis. *Dermatologia Kliniczna*. 2006; 8: 27-32.

# WŁÓKNA Z ALGINIANU WAPNIA ZAWIERAJĄCE NANOHYDROKSYAPATYT

MACIEJ BOGUŃ<sup>1\*</sup>, EWA STODOLAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ TECHNOLOGII  
MATERIAŁOWYCH I WZORNICTWA TEKSTYLÓW,  
KATEDRA WŁÓKNIEN SZTUCZNYCH,  
UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-924 ŁÓDŹ, POLSKA

<sup>2</sup> AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

\* E-MAIL: MACIEK.BOGUN@WP.PL

## Streszczenie

Otrzymano włókna alginianowe zawierające w swojej budowie rozproszony bioaktywny nanododatek hydroksyapatytu. Włókna te charakteryzują się wysokimi właściwościami sorpcyjnymi oraz wartością wytrzymałości właściwej powyżej 20cN/tex odpowiednią do przerobu na kompozyty przeznaczone do zastosowań medycznych.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 70-72]

## Wstęp

Alginiian jest obecnie jednym z najczęściej wykorzystywanych w wielu dziedzinach medycyny [1] liniowym polisacharydem, zbudowanym z reszt kwasu  $\beta$ -D-mannuronowego i  $\alpha$ -L-gulrunowego [2]. Polimer ten ze względu na swoje specyficzne właściwości takie jak, brak toksyczności, antybakteryjność, unikatowa kompatybilność tkankowa oraz kontrolowany czas biodegradacji znalazł także zastosowanie w inżynierii tkankowej do leczenia i regeneracji skóry, chrząstki, kości, wątroby, jak również tkanki mięśnia sercowego [3-7].

Nowym kierunkiem badań realizowanych w wielu ośrodkach badawczych w kraju i na świecie jest wykorzystanie w inżynierii tkankowej nanotechnologii. W dostępnej literaturze przedmiotu przedstawionych jest wiele prac dotyczących otrzymywania nanowłókien z biopolimerów przeznaczonych do otrzymywania 3D-skafołdów, bądź różnego rodzaju membran [8,9]. Alternatywą dla tego rodzaju materiałów może być otrzymywanie klasycznymi metodami przedzenia nanokompozytowych włókien stanowiących substytut do otrzymywania różnego rodzaju biokompozytów. Jak wynika z badań prowadzonych w Zespole Formowania Katedry Włókien Sztucznych Politechniki Łódzkiej istnieje możliwość otrzymania metodą z roztworu na mokro bioaktywnych włókien zawierających różnego rodzaju ceramiczne nanododatki [10-13].

Przedstawiona praca stanowi fragment badań nad opracowaniem warunków wytwarzania włókien z alginianu wapnia zawierających w swojej budowie rozproszony nanododatek hydroksyapatytu. Włókna te ze względu na specyficzne właściwości zarówno tworzywa włókien, jak i stosowanego nanododatku przeznaczone będą do wytwarzania biokompozytów stosowanych w leczeniu ubytków kostnych.

# CALCIUM ALGINATE FIBRES CONTAINING NANOHYDROXYAPATITE

MACIEJ BOGUŃ<sup>1</sup>, EWA STODOLAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup> TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,  
FACULTY OF MATERIAL TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN,  
DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES,  
116 ZEROMSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND

<sup>2</sup> AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

\* E-MAIL: MACIEK.BOGUN@WP.PL

## Abstract

*Alginate fibres containing in their structure a dispersed bioactive hydroxyapatite nano-additive were obtained. These fibres are characterized by high sorption properties and a tensile strength of over 20cN/tex, which is adequate for the production of composites designed for medical purposes.*

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 70-72]

## Introduction

Alginate is a linear polysaccharide made up of  $\beta$ -D-mannuronic and  $\alpha$ -L-guluronic acid residues which is currently very widely used for a variety of medical applications [1,2]. Due to its special features such as non-toxicity, antiseptic qualities, unique tissue compatibility, and controllable time of biodegradation has also been used in tissue engineering for the treatment and regeneration of skin, cartilage, bone, liver as well as heart muscle tissue [3-7].

Recently, a number of research institutes in Poland and abroad have undertaken studies into the applications of nanotechnology in tissue engineering. The available literature on the subject includes a number of papers on obtaining nano-fibres from biopolymers which are designed for the production of 3D-scaffolds and a range of membranes [8, 9]. An alternative for this kind of materials may be traditional spinning of nanocomposite fibres which would be a substitute for the production of a variety of biocomposites. Research conducted by the Formation Team at the Department of Man-Made Fibres of the Technical University of Łódź, it is possible to obtain by wet spinning bioactive fibres containing a range of ceramic nano-additives [10-13].

This work constitutes a part of research aimed at the determination of the conditions for the production of fibres from calcium alginate containing a dispersed hydroxyapatite nano-additive in their structure. These fibres, owing to the special qualities of both the fibre matter and the used nano-additive, will be designed for the production of biocomposites used in the treatment of bone loss.

## Materials and methods

### Characteristics of polymer and nano-additives

Sodium alginate produced by FMC Biopolymer under the commercial name of Protanal LF 10/60LS (a polymer with prevailing  $\beta$ -D-mannuronic acid residues) was used for the preparation of fibres.

Nanohydroxyapatite obtained from AGH in Cracow was used (TABLE 1, FIGURE 1).

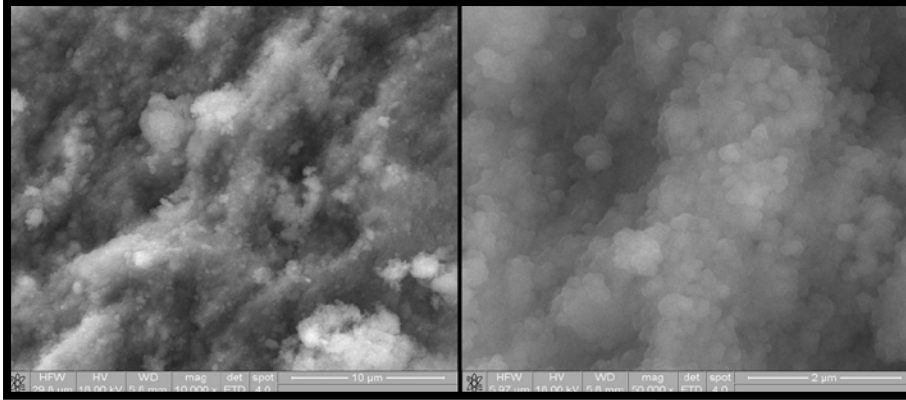
## Materiały i metody badawcze

### Charakterystyka stosowanego polimeru i nanododatku

Do otrzymywania włókien stosowano alginian sodu o nazwie handlowej Protanal LF 10/60LS firmy FMC Biopolymer (polimer o przewadze reszt kwasu  $\beta$ -D-mannuronowego).

W pracy wykorzystano nanohydroksyapatyt (TABELA 1, RYSUNEK 1) otrzymany w AGH Kraków.

Do formowania włókien użyto 7,4% roztworów alginianu sodowego w wodzie destylowanej, zawierających 3% nanododatku w przeliczeniu na masę polimeru. Nanododatek przed wprowadzeniem do roztworu przędzalniczego poddawany był działaniu sondy ultradźwiękowej o mocy 50W w czasie 30min.



RYS. 1. Zdjęcia z mikroskopu elektronowego NANOSEM hydroksyapatytu.  
FIG. 1. Hydroxyapatite micrographs taken with a NANOSEM electron microscope.

### Formowanie włókien

Włókna alginianowe formowano metodą z roztworu na mokro przy użyciu jako rozpuszczalnika wody destylowanej. Stosowano przędzarkę wielkolaboratoryjną, której konstrukcja umożliwiła stabilizację parametrów technologicznych na złożonym poziomie, ciągną ich kontrolę oraz dawała możliwość zmian parametrów procesowych w szerokim zakresie. Proces zestalania włókien z alginianu wapnia prowadzono w kąpeli zawierającej 3%  $\text{CaCl}_2$  i 0,03% HCl w temperaturze 40°C. Proces rozciągania realizowany był dwuetapowo w kąpeli plastyfikacyjnej o takim samym stężeniu jak kąpiel zestalająca w temperaturze 70°C oraz atmosferze przegrzanej pary wodnej o temperaturze 140°C. Włókna odbierano w sposób ciągły, w postaci nawoju na szpulę. Po procesie rozciągania i płukania, włókna były suszone w temp. 25°C w warunkach izometrycznych.

### Metody badawcze

Wytrzymałość właściwa włókien została wyznaczona zgodnie z normą PN-EN ISO 5079:1999.

Sorpcja pary wodnej została oznaczona w warunkach 65% i 100% wilgotności względnej powietrza, zgodnie z Polska Normą PN-71/P-04653.

Retencję wody oznaczano wykorzystując wirówkę laboratoryjną, co umożliwiło mechaniczne usunięcie wody z włókien w procesie odwirowania, z przyspieszeniem 10tys.  $\text{m/s}^2$ . Wartość retencji została wyznaczona poprzez odniesienie masy wody pozostałej we włóknie po odwirowaniu do masy włókna wysuszonego.

### Dyskusja wyników

Wprowadzenie do tworzywa włókien z alginianu wapnia niewłóknotwórczego nanohydroksyapatytu nie powoduje znaczących zmian w wartości sorpcji wilgoci w 65%RH, zarówno dla włókien formowanych przy wyciągu filierowym

TABELA 1. Charakterystyka nanohydroksyapatytu.  
TABLE 1. Nanohydroxyapatite characteristics.

Rodzaj stosowanego nanododatku Type of nano-additive used	Powierzchnia właściwa, (BET) Specific surface (BET) [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	Rozmiar cząstek Partic size [nm]
Hydroksyapatyt, HAp Hydroxyapatite, HAp	73,6	10-1000

Fibres were formed from a 7.4% sodium alginate solution in distilled water, containing 3% of nano-additive in terms of polymer mass. Before it was added to the spinning solution, the nano-additive was subject to a 50W ultrasonic probe over 30 minutes.

### Fibre formation

Alginate fibres were formed from solution by wet spinning with the use of distilled water as a solvent. A large scale laboratory spinning machine was used, which made it possible to stabilize technological parameters at a given level, control them continuously, and change process parameters to a large extent. The process of calcium alginate fibre solidification was carried out in a bath containing 3%  $\text{CaCl}_2$  and 0.03% HCl at a temperature of 40°C.

The drawing process was conducted in two stages in a plasticizing bath at the same concentration as the solidification bath at a temperature of 70°C and in an atmosphere of superheated water steam at a temperature of 140°C. Fibres were continuously taken up and reeled onto a spool. After drawing and washing, fibres were dried at a temperature of 25°C in isometric conditions.

### Research methods

Tensile strength of fibres was determined in accordance to the PN-EN ISO 5079:1999 standard.

Water steam sorption was assayed at a relative humidity of the air of 65% and 100%, in accordance with the Polish Standard PN-71/P-04653.

Water retention was assayed with the use of a laboratory centrifuge, which made it possible to remove water from the fibres at an acceleration of 10 000 $\text{m/s}^2$ . Retention was determined by comparing the mass of water remaining in the fibre after centrifugation and the mass of the dried fibre.

### Discussion of results

The introduction of non-fibrogenic nanohydroxyapatite to calcium alginate fibre matter does not cause substantial changes in the value of moisture sorption at 65%RH, either for fibres formed at an as-spun draw ratio of +50% or +90% (TABLE 2). It is well known that the value of this parameter largely depends on the chemical structure of fibre matter. Some small changes in moisture sorption at 100%RH as well as in water retention may be caused by the different total pore volume and the character of the porous structure produced. The introduction of nanohydroxyapatite to fibre matter in the case of both as-spun draw ratios results in a slight increase in the total pore volume to 0.245 $\text{cm}^3/\text{g}$  for fibres formed at an as-spun draw ratio of +90% (TABLE 2). At the same time, both fibres with and without the nano-additive are characterized by a low total internal pore surface.

**TABELA 2. Struktura i właściwości nanokompozytowych włókien z alginianu wapnia.**  
**TABLE 2. Structure and properties of nanocomposite calcium alginate fibres.**

Symbol próbki Sample symbol	Wyciąg filerowy As-spun draw ratio [%]	Rozciąg całkowity Total drawing [%]	Całkowita objętość por Total pore volume [cm <sup>3</sup> /g]	Całkowita powierzchnia wewnętrzna Total internal surface [m <sup>2</sup> /g]	Sorpccja wilgoci Moisture sorption		Retencja wody Water Retention [%]	Wytrzymałość właściwa Tenacity [cN/tex]
					w 65%RH at 65%RH [%]	w 100%RH at 100%RH [%]		
AC 1	+50	101,78	0,102	10,51	24,63	47,98	101,46	24,19
AC 3	+90	109,18	0,204	13,99	24,49	47,56	86,23	23,06
AH 1	+50	110,66	0,139	4,93	25,39	48,23	94,74	24,39
AH 3	+90	97,90	0,245	21,15	24,38	44,57	84,50	24,13

na poziomie +50%, jak również przy wyciągu filerowym równym 90% (TABELA 2). Wiadomo bowiem, iż wartość tego parametru w znaczącym stopniu uzależniona jest od budowy chemicznej tworzywa włókien. Niewielkie zmiany w przypadku sorpcji wilgoci w 100%RH, jak również w przypadku retencji wody mogą być spowodowane najprawdopodobniej zróżnicowaną całkowitą objętością por, jak i charakterem wytworzonej struktury porowatej. Wprowadzenie do tworzywa włókien nanohydroksyapatytu w przypadku stosowania obu wartości wyciągu filerowego powoduje nieznaczny wzrost całkowitej objętości por do poziomu 0,245cm<sup>3</sup>/g w przypadku włókien formowanych przy wyciągu filerowym na poziomie +90% (TABELA 2). Jednocześnie, zarówno włókna bez nanododatku, jak i włókna zawierające nanohydroksyapatyt posiadają niską wartość całkowitej powierzchni wewnętrznej por. Wszystkie rodzaje wytworzonych włókien odznaczają się dużym udziałem por dużych i bardzo dużych (powyżej 50%), co świadczy o makroporowatym charakterze wytworzonej struktury porowatej.

Z wprowadzeniem do tworzywa włókien niewłóknotwórczego nanododatku związane są niewielkie zmiany wartości wytrzymałości właściwej włókien, co może świadczyć o dość znikomym wpływie, małych ilości tego nanododatku na parametry wytrzymałościowe włókien z alginianu wapniowego (TABELA 2). Podobny wpływ nanohydroksyapatytu został przez nas stwierdzony w przypadku innego tworzywa włóknotwórczego [13].

Określenie wpływu parametrów procesu wytwarzania nanokompozytowych włókien z alginianu wapnia na strukturę nadmolekularną, porowatą i właściwości wytrzymałościowe będzie przedmiotem odrębnej publikacji.

## Podsumowanie

W ramach pracy otrzymano włókna z alginianu wapniowego zawierające w swojej budowie rozproszony nanododatek hydroksyapatytu. Włókna formowane przy wyciągu filerowym +90% charakteryzują się podwyższoną porowatością, o czym świadczy wartość całkowitej objętości por na poziomie 0,245cm<sup>3</sup>/g. Wytrzymałość włókien powyżej 24cN/tex umożliwia wykorzystanie tych włókien do wytwarzania biokompozytów przeznaczonych do zastosowań medycznych.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008-2010 jako projekt badawczy (3809/B/T02/2008/35).

All the types of fibres produced have a considerable proportion of large and very large pores (over 50%), which indicates the macroporous character of the created porous structure.

The introduction of a non-fibrogenic nano-additive to the fibre matter results in only minor changes in fibre tenacity, which shows that the tensile parameters of calcium alginate fibres are hardly affected by small quantities of this nano-additive. A similar action of nanohydroxyapatite has been observed by the authors in the case of another fibrogenic matter [13].

Research into the relationship between the production parameters of nanocomposite calcium alginate fibres and their supramolecular structure, porosity, and tensile strength shall be the subject of another publication.

## Summary

In this study, calcium alginate fibres containing a dispersed hydroxyapatite nano-additive in their structure were obtained. Fibres formed at an as-spun draw ratio of +90% are characterized by an increased porosity with the total pore volume of 0.245cm<sup>3</sup>/g. The tenacity of the fibres of over 24cN/tex is sufficient for them to be used for the production of biocomposites designed for medical applications.

## Acknowledgements

The authors thank the Ministry of Science and Higher Education for the financial support of this work (3809/B/T02/2008/35).

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Kong, H.J.; Kaigler, D.; Kim, K.; Mooney, D.J. *Biomacromolecules* 2004, 5, 1720.
- [2] Draget, K.I.; Skjåk-Bræk, G.; Simdsrød, O. *Int. J. Biol. Macromol.* 1997, 21, 47.
- [3] Hashimoto, T.; Suzuki, Y.; Yamamoto, E.; Tanihara, M.; Kakimaru, Y.; Suzuki, K. *Biomaterials* 2004, 25, 1407.
- [4] Bouhadir, K.H.; Lee, K.Y.; Alsberg, E.; Damm, K.L.; Anderson, K.W.; Mooney, D.J. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17, 945.
- [5] Alsberg, E.; Anderson, K.W.; Albeiruti, A.; Franceschi, R.T.; Mooney, D.J. *J.Dent. Res.* 2001, 80, 2025.
- [6] Chung, T.W.; Yang, J.; Akaike, T.; Cho, K.Y.; Nah, J.W.; Kim, S.I.; Cho, C.S. *Biomaterials* 2002, 23, 2827.
- [7] Nie, H.; He, A.; Zheng, J.; Xu, S.; Li, J.; Han, Ch.C. *Biomacromolecules* 2008, 9, 1362.
- [8] Despang, F.; Bernhardt, A.; Hanke, Th.; Pompe, W.; Gelinsky, M. *J. Am. Ceram. Soc.* 2007, 90, 1703.
- [9] Sakai, S.; Yamaguchi, S.; Takei, T.; Kawakami, K. *Biomacromolecules* 2008, 9, 2036.
- [10] Mikołajczyk, T.; Boguń, M.; Rabiej, S. *J. Appl. Polym. Sci.* 2007, 105, 2346.
- [11] Mikołajczyk, T.; Boguń, M.; Szparaga, G. *Fibres&Textiles East. Eur.* 2007, 3, 25.
- [12] Mikołajczyk, T.; Boguń, M.; Błażewicz, M.; Piekarczyk, I. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 100, 2881.
- [13] Mikołajczyk, T.; Rabiej, S.; Boguń, M. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 101, 760.

# WŁÓKNA POLIAKRYLONITRYLO- WE MODYFIKOWANE NANODO- DATKIEM SREBRA ORAZ UKŁA- DEM DWÓCH NANODODATKÓW: SREBRA I HYDROKSYAPATYTU

TERESA MIKOŁAJCZYK\*, GRZEGORZ SZPARAGA

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ TECHNOLOGII  
MATERIAŁOWYCH I WZORNICTWA TEKSTYLÓW,  
KATEDRA WŁÓKNIEN SZTUCZNYCH

\* E-MAIL: MIKOLTER@P.LODZ.PL

## Streszczenie

*W pracy zbadano wpływ wyciągu filierowego na właściwości nanokompozytowych włókien PAN zawierających alternatywnie nanosrebro bądź układ dwóch nanododatkiów: nanosrebro i hydroksyapatyt.*

*Otrzymane włókna charakteryzowały się wytrzymałością na poziomie zbliżonym do 40 cN/tex oraz podwyższoną porowatością.*

**Słowa kluczowe:** włókna prekursorowe, nanododatki

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 73-75]

## Wstęp

Zastosowanie nanokompozytu poliakrylonitrylu jako prekursora do otrzymywania włókien węglowych do zastosowań medycznych daje możliwość nadania włóknom węglowym otrzymanym z takiego prekursora specyficznych właściwości wynikających z charakteru wprowadzonego nanododatku.

W przypadku wprowadzenia do tworzywa włókien PAN nanosrebra przewiduje się, iż włókna węglowe otrzymane z takiego prekursora wykazywać będą działanie antybakteryjne, które jest przypisywane srebru. Można sądzić, iż implanty otrzymane na bazie tego typu włókien węglowych przyczynią się w istotny sposób do ograniczenia powikłań pooperacyjnych wynikających z możliwości kolonizacji bakterii w okolicach wszczepu, a tym samym wpłyną korzystnie na czas rehabilitacji pacjentów.

W przypadku wprowadzenia do tworzywa włókien PAN nanosrebra oraz nanohydroksyapatytu oprócz działania antybakteryjnego otrzymane włókna będą charakteryzować się podwyższoną zgodnością z tkankami wynikającą z obecności hydroksyapatytu, który stanowi 70% części nieorganicznej kości i jest najlepszym spośród znanych biomateriałów.

## Materiały i metody badawcze

Do sporządzania roztworów przedzalniczych PAN w dwumetyloformamidzie (DMF) stosowano kopolimer trójskładnikowy poliakrylonitrylu produkcji węgierskiej firmy Zoltek. Lepkość istotna kopolimeru wyznaczona w temperaturze 20°C w DMF-ie wynosiła 1,29dl/g.

Polidispersyjność wyznaczono metodą chromatografii żelowej i wynosiła  $M_w/M_n=3,1$  (badania wykonano w Instytucie Biopolimerów i Włókien Chemicznych w Łodzi).

### Nanododatki

Nanosrebro – produkt handlowy firmy Aldrich o numerze asortymentowym 576832.

Nanohydroksyapatyt – nanododatek otrzymany w AGH Kraków.

# POLYACRYLONITRILE FIBRES MODIFIED WITH A SILVER NANO- ADDITIVE AND A SYSTEM OF TWO NANO-ADDITIVES: SILVER AND HYDROXYAPATITE

TERESA MIKOŁAJCZYK\*, GRZEGORZ SZPARAGA

TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF MATERIAL  
TECHNOLOGIES AND TEXTILE DESIGN,  
DEPARTMENT OF MAN MADE FIBRES

\* E-MAIL: MIKOLTER@P.LODZ.PL

## Abstract

*This paper explores the influence of the as-spun draw ratio on the properties of nanocomposite PAN fibres containing either nanosilver or a system of two nano-additives: nanosilver and hydroxyapatite.*

*The fibres obtained were characterized by a tensile strength of approximately 40 cN/tex and an increased porosity.*

**Keywords:** precursor fibres, nanoadditives

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 73-75]

## Introduction

The use of a polyacrylonitrile nanocomposite as a precursor for the production of carbon fibres for medical applications makes it possible to impart special qualities related to the character of the introduced nano-additive to the carbon fibres obtained from such a precursor.

In the case of the introduction of nanosilver to PAN fibre matter, it is to be expected that carbon fibres obtained from such a precursor will demonstrate the antibacterial qualities characteristic of silver. Implants produced on the basis of this type of carbon fibres may therefore contribute to a substantial reduction in post-operative complications related to bacterial colonization in the neighbourhood of the implant, and thus they will help to shorten the patients' rehabilitation time.

If both nanosilver and nanohydroxyapatite are used with PAN fibre matter, the resulting fibres will be characterized, apart from antibacterial qualities, by an increased compatibility with tissues owing to the presence of hydroxyapatite, which constitutes 70% of the inorganic part of bone and is the best biomaterial known to date.

## Materials and research methods

The ternary copolymer of polyacrylonitrile (produced by Hungarian company Zoltek) was used for preparation of the PAN spinning solutions in dimethylformamid (DMF). The significant viscosity of the copolymer determined in 20°C in DMF was 1,29dl/g.

Polydispersion was determined using the gel chromatography method and was equal to  $M_w/M_n=3,1$  (the research was made in the Institute of Biopolymers and Chemical Fibres in Łódź).

### Nanoadditives

Nano-silver – commercial product of Aldrich company with number 576832.

Hydroxyapatite – product of AGH Cracow.



Włókna formowano metodą z roztworu na mokro. Jako roztworów przędzalniczych użyto 22% roztworów poliakrylonitrylu w DMF-ie zawierających 1% nanosrebra, bądź 1% nanosrebra oraz 3% nanohydroksyapatytu w przeliczeniu na masę polimeru. Nanododatki były poddawane działaniu ultradźwięków w czasie 30 minut o mocy 100W przy zastosowaniu sondy ultradźwiękowej Bandelin Sonopuls 2200 HD, postaci zawiesiny w DMF. Tak przygotowaną zawiesinę wprowadzono do roztworu przędzalniczego w trakcie jego sporządzania.

Do formowania stosowano dyszę przędzalniczą 240 otworkową o średnicy otworków 0,08mm. Proces zestalania włókien przeprowadzono w kąpeli zawierającej wodny roztwór DMF-u o stężeniu 60% o temperaturze 25°C, przy wyciągu filierowym wynoszącym alternatywnie +10 bądź -10%. Proces rozciągu realizowano dwuetapowo: w kąpeli plastyfikującej (zawierającej wodny roztwór DMF o stężeniu 50%) oraz w atmosferze przegrzanej pary wodnej (temperatura 135°C).

Wytrzymałość właściwą przy zerwaniu wyznaczano dla wiązki włókien według Normy Polskiej PN-EN-ISO-268:1997, przy użyciu maszyny wytrzymałościowej typu Instron.

Porowatość włókien oznaczono metodą porozymetrii ręciovowej stosując porozymetr Carlo-Erba sprzężony z systemem komputerowym, umożliwiającym oznaczenie całkowitej objętości por, udziału procentowego por o rozmiarach z zakresu 5–7500nm oraz całkowitej powierzchni wewnętrznej por.

## Dyskusja wyników

Na podstawie wyników badań otrzymanych dla włókien nanokompozytowych zawierających nanosrebro można stwierdzić, iż stosowanie ujemnych wartości wyciągu filierowego pozwala na uzyskanie włókien o strukturze bardziej podatnej na procesy deformacyjne w etapie rozciągu, w porównaniu do włókien formowanych przy zastosowaniu dodatniej wartości wyciągu filierowego. Zwiększonej wartości rozciągu całkowitego towarzyszy wzrost wartości wytrzymałości właściwej tych włókien. Takie zjawisko jest zgodne z ogólną zasadą otrzymywania metodą z roztworu na mokro włókien o podwyższonych właściwościach wytrzymałościowych [1]. Z odwrotną sytuacją mamy do czynienia w przypadku włókien nanokompozytowych zawierających układ dwóch nanododatków: srebro i hydroksyapatyt. W tym przypadku zastosowanie dodatniej wartości wyciągu filierowego sprzyja uzyskiwaniu włókien o strukturze wykazujących wyższą podatność na procesy deformacyjne w etapie rozciągu. Zjawisko to nie przekłada się jednak na wartości wytrzymałości właściwej otrzymanych włókien, bowiem pomimo mniejszej deformacji nadanej w etapie rozciągu, włókna formowane przy ujemnej wartości wyciągu

Fibres were formed using the wet spinning solution method. As spinning solutions were used the solutions of 22% of polyacrylonitrile in DMF containing 1% of nano-silver or 1% of nano silver and 3% of nano hydroxyapatite. The nano-additive was dispersed in DMF by ultrasounds using a Bandeline SONOPULS HD 2200 ultrasound probe for 30 minutes. Suspension prepared in such way was inserted into the spinning solution during its preparation.

The spinning nozzle with 240 holes and with the diameter of holes of 0,08mm was used to forming of fibres. The process of solidification of fibres was performed in the bath containing water solution of DMF at 60% concentration, the temperature was 25°C and the as-spun-draw-out ratio was -10% or alternatively +10%. The process of extension of fibres was realised in two stages: in a plastifying bath (containing water solution of DMF at 50% concentration) and in the atmosphere of overheated steam (temperature of 135°C).

The tenacity at break was determined for a bundle of fibres according to the Polish Norm PN-EN-ISO-268:1997, with the use of Instron strength machine.

The porosity of fibres was determined using the mercury porosimetry method with the use of Carlo-Erba porosimeter connected with the computer system, enabling the determination of total volume of pores, the percentage share of pores with dimension from the range of 5–7500nm and the total inner surface of pores.

## Discussion of results

Studies on nanocomposite fibres containing nanosilver reveal that the application of negative as-spun draw ratios makes it possible to obtain fibres with a structure that is more readily susceptible to deformation at drawing, as compared to fibres formed at positive as-spun draw ratios. Increased total drawing results in a higher tensile strength of these fibres. This phenomenon is in accordance with the general principles of wet spinning of fibres with increased tensile properties. However, the opposite is true in the case of nanocomposite fibres with a system of two nano-additives: silver and hydroxyapatite. Here, the application of positive as-spun draw ratios leads to the production of fibres with a higher deformability at drawing. This phenomenon, however, does not translate into a higher tensile strength of the fibres obtained, as in spite of lower deformation at the stage of drawing, fibres formed at negative as-spun draw ratios show higher tensile properties. However, this is accompanied by a higher total pore volume at a lower internal area (a microporous structure). To recapitulate, it appears that in the case of both types of nanocomposite fibres, the use of negative as-spun draw ratios resulted in the preparation of fibres with higher tensile properties as compared to fibres formed at positive as-spun draw ratios.

TABELA 1. Właściwości otrzymanych włókien nanokompozytowych.

TABLE 1. Properties of obtained nanocomposite fibres.

Symbol Włókien	Wyciąg Filierowy	Rozciąg w kąpeli plastyfikacyjnej	Rozciąg w parze	Rozciąg całkowity	Wytrzymałość	Wydłużenie przy zerwaniu	Całkowita objętość por	Powierzchnia Wewnętrzna
Sample symbol	As-spun draw ratio	Draw ratio in plastification bath	Draw ratio in steam	Total draw ratio	Tenacity	Elongation at break	Total volume of pores	Inner surface
	[%]	[%]	[%]	[%]	[cN/tex]	[%]	[cm <sup>3</sup> /g]	[m <sup>2</sup> /g]
SG5	+10	310,99	123,61	817,02	35,21	11,50	0,484	20,820
SG7	-10	320,13	145,47	931,32	39,64	11,95	0,572	18,788
GH5	+10	286,11	145,61	848,35	39,91	11,88	0,395	18,759
GH8	-10	265,68	173,67	800,64	42,94	13,48	0,476	14,233

filierowego wykazują wyższe właściwości wytrzymałościowe. Towarzyszy temu wyższa całkowita objętość por przy jednocześnie niższej powierzchni wewnętrznej (makroporowaty charakter struktury). Reasumując można stwierdzić, iż w przypadku obu typów włókien nanokompozytowych zastosowanie ujemnych wartości wyciągu filierowego wiązało się z uzyskaniem włókien o wyższych właściwościach wytrzymałościowych w porównaniu z włóknami formowanymi przy zastosowaniu dodatniej wartości wyciągu filierowego.

Analizując właściwości wytrzymałościowe otrzymanych włókien w aspekcie ilości wprowadzonych do ich tworzywa nanododatków należy zwrócić uwagę, iż włókna do tworzywa których wprowadzono układ dwóch nanododatków (łączny udział nanododatków wynosił 4% w przeliczeniu na masę polimeru) wykazują znacznie wyższe właściwości wytrzymałościowe w porównaniu do włókien zawierających jedynie nanosrebro w ilości 1% w przeliczeniu na masę polimeru. Takie zjawisko obserwuje się w przypadku izotropowych nanokompozytów polimerowych, gdzie zwiększony udział nanododatku powoduje wzrost wytrzymałości nanokompozytu [2]. Natomiast w przypadku włókien, które są ciałami anizotropowymi, których wytrzymałość w głównej mierze zależy od orientacji elementów strukturalnych powstałej w trakcie ich rozciągania, obecność niewłóknotwórczych nanododatków powoduje obniżenie wytrzymałości włókien [3] (wyjątek stanowią włókna zawierające nanorurki węglowe [4]). Zjawisko to może być najprawdopodobniej związane z przebudową struktury krystalicznej włókien, związaną z obecnością w ich tworzywie hydroksyapatytu, co zostało już opisane w pracy [5].

## Podsumowanie

Włókna z nanokompozytu PAN zawierające nanosrebro oraz układ dwóch nanododatków: nanosrebro oraz hydroksyapatyt łączą podwyższoną całkowitą objętość z wytrzymałością właściwą powyżej 40cN/tex. Jest to korzystne ze względu na przeznaczenie uzyskanych z nich włókien węglowych do zastosowań medycznych.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008-2010 jako projekt badawczy (3808/B/T02/2008/35).*

Analyzing tensile strength properties of the fibres obtained with respect to the quantity of nano-additives introduced to fibre matter, it needs to be stressed that fibres obtained from fibre matter with a system of two nano-additives (the combined proportion of nano-additives was 4% in terms of polymer weight) exhibit much higher tensile strength properties as compared to fibres containing only 1% nanosilver in terms of polymer weight. This is true for isotropic polymer nanocomposites, where an increased level of nano-additives results in a higher tensile strength of the nanocomposite [2]. However, in the case of anisotropic fibres, whose tensile strength largely depends on the orientation of the elements of the structure created in the course of drawing, the presence of non-fibrogenic nano-additives leads to a decreased fibre tensile strength [3] (fibres containing carbon nanotubes are an exception [4]). This phenomenon may be connected to the transformation of the crystalline structure of fibres, which is related to the presence of hydroxyapatite in the fibre matter, which was described in paper [5].

## Summary

Nanocomposite PAN fibres containing nanosilver or a system of two nano-additives: nanosilver and hydroxyapatite exhibit both an increased total volume and a tensile strength of over 40cN/tex. This is useful from the point of view of the application of the carbon fibres obtained from them for medical purposes.

## Acknowledgements

*The authors thank the Ministry of Science and Higher Education for the financial support of this work (3808/B/T02/2008/35).*

## Piśmiennictwo

- [1] Mikołajczyk T.; Modification of the Manufacturing Process of Polyacrylonitrile Fibres, Scientific Bulletin of Technical University of Lodz, 1997, No 781, Scientific Theses Z 243.  
 [2] S. Sinha Ray, M. Okamoto; Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing; Progress in Polymer Science; 28 (2003) 1539-1641.  
 [3] T. Mikołajczyk, G. Janowska, M. Wójcik, M. Boguń, A. Kurzak; Influence of the Amount of Ferromagnetic Addition on the Rheological Properties of Spinning Solutions, the Structure, the Strength, and Thermal Properties of Polyacrylonitrile Fibres; Journal of Applied Polymer Science; 109 (2008) 2513-2521.

## References

- [4] T.V. Sreekumar, T. Liu, B.G. Min, H. Guo, S. Kumar, R.H. Hauge, R.E. Smalley; Polyacrylonitrile single-walled carbon nanotube composite fibers; Advanced Materials 16 No. 1 (2004) 58-61.  
 [5] T. Mikołajczyk, S. Rabiej, M. Boguń; Analysis of the structural parameters of polyacrylonitrile fibers containing nanohydroxyapatite; Journal of Applied Polymer Science 101 (2006) 760-765.

# RUSZTOWANIA HYDROKSY- APATYTOWE DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH WYKONANE METODĄ „ROBOCASTING” – WSTĘPNE TESTY

KAROL GRYN<sup>1\*</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>2</sup>

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

<sup>1</sup> WYDZIAŁ METALI NIEŻELAZNYCH

<sup>2</sup> WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI

\* E-MAIL: KGRYN@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

Celem prowadzonych badań było wstępne przebadanie i opisanie własności fizycznych, mechanicznych i biologicznych porowatych rusztowań hydroksyapatytowych wykonanych metodą „Robocasting”. Badaniom poddano próbki o różnych wariantach geometrii strukturalnej przy zachowaniu tych samych wymiarów zewnętrznych. Wydrukowano trzy rodzaje próbek: siatka gęsta, siatka rzadka, materiał lity. Własności wytrzymałościowe wyznaczono w próbie trójpunktowego zginania. Stwierdzono, że w porównaniu z kością naturalną własności wytrzymałościowe próbek są niższe i pogarszają wraz ze wzrostem makroporowatości. Złożoną mikro i makro strukturę wydrukowanych i spieczonych próbek pokazano na zdjęciach wykonanych przy użyciu mikroskopu skaningowego (SEM). Nie stwierdzono defektów o innej niż osnowa mikrostrukturze. Materiał po spiekaniu był jednorodny w całej objętości (nawet w miejscach połączenia warstw). Wykonano testy w środowisku SBF (simulated body fluid). Po 8 dniach inkubacji zaobserwowano na powierzchni próbek pojawienie się kalafiorowatych struktur apatytowych, a dodatkowo po 14 dniach narosły kryształki chlorkowe.

Po przeprowadzonych analizach stwierdzono, że mimo niskich własności wytrzymałościowych drukowane struktury przestrzenne mogą służyć do zastosowań medycznych. Wystarczająca sztywność, odpowiednia porowatość a także biogodność pozwala na ich zastosowanie jako rusztowań dla komórek – skafoldów. Dodatkową zaletą metody „Robocasting” jest możliwość wykonywania obiektów o dowolnych kształtach, dzięki czemu idealne dopasowanie implantu np.: do ubytku, który ma być wypełniony, nie następuje trudności. Dalsze badania będą nastawione na testy odpowiedzi komórkowej (in vitro i in vivo) w celu dokonania pełnego opisu materiału.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 76]

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu numer: 17.17.160.408.

# HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS BY „ROBOCASTING” FOR MEDICAL APPLICATIONS – PRELIMINARY TESTS

KAROL GRYN<sup>1\*</sup>, JAN CHŁOPEK<sup>2</sup>

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,  
30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>1</sup> FACULTY OF NON-FERROUS METALS

<sup>2</sup> FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS

\* E-MAIL: KGRYN@AGH.EDU.PL

## Abstract

The purpose of this preliminary research was to investigate and describe mechanical properties, micro and macro structure and the behavior in immersion solution of 3D hydroxyapatite structures manufactured by “Robocasting”. Three different macrostructures were printed and taken under investigation: fine grid, coarse grid and bulk material. It was observed that mechanical properties of such samples in comparison with natural bone are lower and deteriorate with porosity (the bigger macroporosity the lower mechanical properties). For structural analysis of printed and sintered samples scanning electron microscope (SEM) pictures were taken. No defects, bonding or other imperfection in the macrostructure were found. Material was fully homogenous even in layer-to-layer contact areas. Biological activity was tested in simulated body fluid (SBF). After 8 days of incubation SEM pictures revealed apatite structures formed on the samples’ surface. Some chloride crystals were observed after 14 days.

Analyses show that low mechanical properties are not decisive and do not exclude such structures from medical applications. Sufficient stiffness, appropriate porosity and biocompatibility allow to use them as scaffolds for bone cells growth. Another big advantage of “Robocasting” is an arbitrary shape of manufactured samples. It gives an opportunity to create scaffold (implant) perfectly fitted e.g. to fill the bone tissue defects. That is why consecutive research will be focused on more accurate tests (in vitro and in vivo) to fully describe of manufactured structures.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 76]

## Acknowledgements

This work was financially supported by research program No. 17.17.160.408.

# BADANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH SKÓRY

SYLWIA SZOTEK<sup>1\*</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOBIELARZ<sup>1</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWICKA<sup>2</sup>,  
STANISŁAW PIELKA<sup>2</sup>, PIOTR KUROPKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,  
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI  
EKSPERYMENTALNEJ,

UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLSKA

<sup>2</sup> AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,  
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW,  
UL. PONIATOWSKIEGO 2, 50-326 WROCŁAW, POLSKA

<sup>3</sup> UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU,  
WYDZIAŁ MEDYCZYNY WETERYNARYJNEJ,  
KATEDRA ANATOMII I HISTOLOGII,  
UL. KOZUCHOWSKA 1/3, 51-631 WROCŁAW, POLSKA

\* E-MAIL: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 77-79]*

## Wstęp

Skóra jest niezwykle złożonym narządem pod względem zarówno budowy jak i pełnionych funkcji. Większość prac podaje opisy skóry bazujące na zależnościach empirycznych. Brak jest informacji o korelacji właściwości mechanicznych ze strukturą i budową wewnętrzną (rozkładem włókien kolagenowych i elastynowych tworzących podstawową sieć wewnętrzną skóry). Stworzenie takiego opisu jest istotne, ze względu na możliwości opracowania nowych metod diagnostycznych.

## Materiał i metoda

Celem prezentowanej pracy było wyznaczenie właściwości mechanicznych skóry dla różnych kierunków wycięcia próbek i opisanie zmian jej mikrostruktury. Skórę użytą do badań pobrano z 20 różnych królików (samic) w wieku od około 6 do 12 miesięcy. Próbkę uzyskano z okolicy grzbietu królików. Każdą testowaną próbkę wycięto przy użyciu standardowego wykrojnika. Pobierano trzy lub więcej próbek w kierunkach: wzdłużnym i poprzecznym do linii grzbietu. Wymiary próbek wynosiły: 10mm szerokość i 15mm długość. Uchwyt z próbkami skóry (RYS. 1b) mocowano w maszynie wytrzymałościowej (MTS, model Synergie 100) (RYS. 1a). W celu wyeliminowania efektu histerezy tkanek, podczas pomiaru, wszystkie próbki były wstępnie obciążane do osiągnięcia 20% odkształcenia próbki (15mm) dla 3 cykli. W trakcie trwania cykli wstępnych i testu prowadzącego do zniszczenia próbki były rozciągane z prędkością 4 mm/min [1]. Badania prowadzono w temperaturze pokojowej, odpowiednią wilgotność próbek uzyskiwano dzięki zastosowaniu soli fizjologicznej. Wartości siły i przemieszczenia uzyskane w trakcie testu były, przekształcane do wartości naprężenia i odkształcenia [4].

Dla każdej testowanej próbki uzyskano charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe. W przeprowadzonych badaniach wyznaczono maksymalne wartości naprężenia ( $\sigma_{MAX}$ ) skóry. Umowne moduły Younga ( $E$ ) wyznaczono dla odcinka prostoliniowego krzywej naprężeniowo-odkształceniowej [1,2,4].

Do badań histologicznych próbki skóry pobrano przed (próbki kontrolne) i krótko po przeprowadzeniu testów biomechanicznych. Próbkę zabezpieczono w roztworze formaliny. Po opłukaniu pod bieżącą wodą materiał został

# INVESTIGATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF THE SKIN

SYLWIA SZOTEK<sup>1\*</sup>, ROMUALD BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOBIELARZ<sup>1</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWICKA<sup>2</sup>,  
STANISŁAW PIELKA<sup>2</sup>, PIOTR KUROPKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS,

7/9 LUKASIEWICZA STR., 50-371 WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup> WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY,  
DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS,  
2 PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND

<sup>3</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES,  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE,  
DEPARTMENT OF ANIMAL ANATOMY AND HISTOLOGY,  
1/3 KOZUCHOWSKA STR. 1/3, 51-631 WROCLAW, POLAND

\* E-MAIL: SYLWIA.SZOTEK@PWR.WROC.PL

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 77-79]*

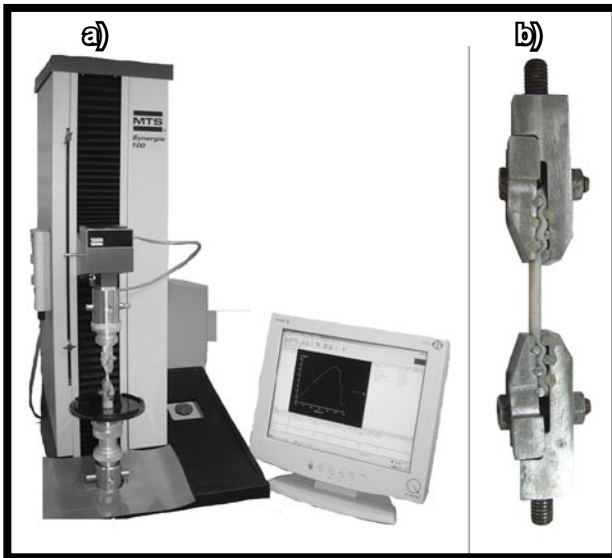
## Introduction

Skin is a highly complex organ with regard to both its structure and performed functions. The majority of publications give descriptions of skin based on empirical dependencies. Information, in which the distribution of mechanical properties is correlated with the structure and internal composition (distribution of collagen and elastin fibres making basic, internal net of the skin) are scarce. Making such description is indispensable particularly to develop new diagnostic models.

## Materials and methods

The objective of this study was to measure the mechanical properties of the skin in the different direction and observation changing microstructure. The skin samples used in the study were collected from 20 different rabbits (females) about from 6 to 12 month old. All samples were obtained from the rabbits' upper back. For each skin test specimens were cut out by the use of standard punch three or more in the longitudinal and three or more in the transverse (perpendicular) direction. The dimensions of the specimens were 10mm wide by 15mm long. The clamped with skin specimens (FIG. 1b) were mounted in a materials testing machine (MTS, model Synergie 100) (FIG. 1a). To eliminate the effect of hysteresis of the tissue during the test, each specimen was preconditioned with 20% elongation (gauge length: 15mm) for 3 cycles. During preconditioning and load to failure testing, specimens were tested at an elongation rate of 4 mm/min resulting [1]. The test was performed at room temperature and the specimen was kept moist with saline solution. The force and extension data, obtained during the test, were transformed into stress and strain [4]. The stress-strain curve was plotted for each of the specimens tested. In this investigations we obtained value of maximum stress ( $\sigma_{MAX}$ ) of the skin. The assumed Young's modulus of elasticity ( $E$ ) were calculated from the linear part of the stress-strain curve [1,2,4].

For histological examinations tissue samples were taken before (control samples) and shortly after biomechanical tests. Samples were buffered formalin solution. After rinsing in tap water, material was dehydrated in alcohol and embedded in paraffin. Slices (3 $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin and eosin method according to Delafield and additionally Van Gison method for elastic fibers was applied.



**RYS. 1. Stanowisko pomiarowe – MTS Synergie 100 (a); próbka w specjalnych uchwytach (b) przed zamocowaniem w maszynie wytrzymałościowej.**  
**FIG. 1. Experimental setup – MTS Synergie 100; specimen in the special clamps (b) prior to mounting on materials testing machine.**

odwodniony w alkoholu i zalany w parafinie. Skrawki (3 $\mu$ m grubości) wybarwiono w hematoksylinie i eozynie metodą wg Delafielda i dodatkowo metodą Van Gison, stosowaną do barwienia włókien sprężystych.

## Wyniki

Dla wszystkich badanych próbek skóry otrzymano nieliniowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe (FIG. 2). Maksymalne wartości naprężenia ( $\sigma_{MAX}$ ) uzyskane dla próbek pobranych w kierunku wzdłużnym były o około 25% większe niż wartości uzyskane dla kierunku poprzecznego (FIG. 3a). Wartości umownego modułu Younga (E) otrzymane dla kierunku wzdłużnego były większe o ok. 35% od wartości uzyskanych dla próbek pobranych w kierunku poprzecznym (FIG. 3b).

W analizowanych preparatach histologicznych większość włókien kolagenowych przebiegała odpowiednio do wzdłużnej osi ciała zwierząt, w ich otoczeniu znajdowały się niewielkie ilości włókien elastyny. Po rozciągnięciu próbek, losowo ułożone włókna układały się zgodnie z kierunkiem działania siły.

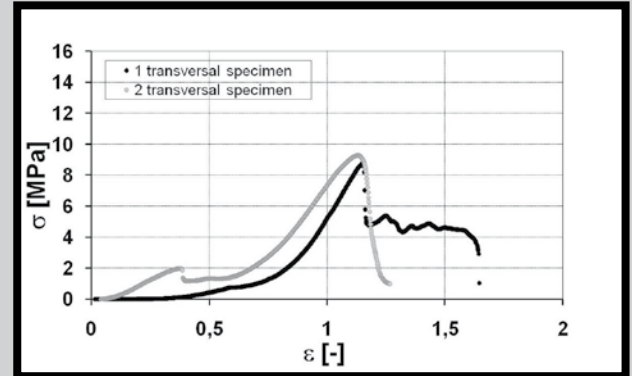
## Wnioski

W przeprowadzonych badaniach, właściwości mechaniczne skóry, dla różnych kierunków pobrania, wyznaczono po przeprowadzeniu testów jednoosiowego rozciągania. Kolejnym etapem badań będą testy wytrzymałościowe dwu- i wieloosiowe oraz pomiar parametrów skóry z zastosowaniem spektroskopii Ramana [3,4].

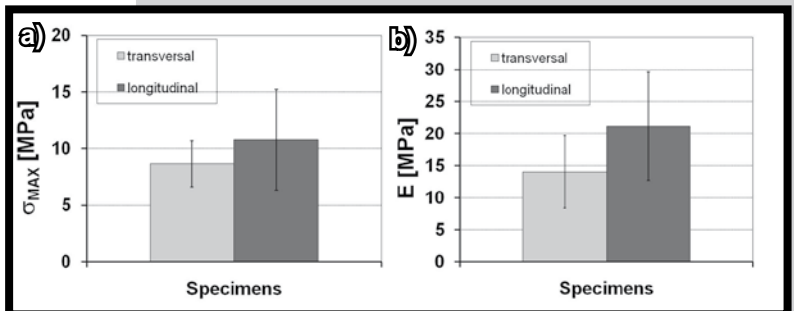
Zakończona sukcesem korelacja właściwości mechanicznych skóry z obrazami diagnostycznymi, uzyskanymi metodami spektroskopowymi oraz wynikami badań mikroskopowych umożliwi, na podstawie prostego badania (możliwego do realizacji w warunkach klinicznych) określenie mapy właściwości skóry na powierzchni całego ciała pacjenta oraz zaprojektowanie przebiegu zabiegu chirurgicznego w sposób optymalny.

## Results

For all specimens, the stress-strain curves are non-linear (FIG. 2). The maximum stress ( $\sigma_{MAX}$ ) of specimens in the longitudinal direction, was higher for about 25% than the transversal direction (FIG. 3a). The assumed Young's modulus of elasticity (E) was higher in the longitudinal direction for about 35% than in transversal direction (FIG. 3b).



**RYS. 2. Przykładowe krzywe naprężeniowo-odkształceniowe dla próbek pobranych w kierunku poprzecznym.**  
**FIG. 2. Example of stress-strain curves from transverse skin specimens.**



**RYS. 3. Wykresy maksymalnej wartości naprężenia ( $\sigma_{MAX}$ ) (a) i umownego modułu Younga (E) (b) dla skóry pobranej w różnych kierunkach.**

**FIG. 3. Graphs of the maximum values of the stress ( $\sigma_{MAX}$ ) (a) and assumed Young's modulus (E) (b) of skin cut in different directions.**

In examined samples most of collagen fibers run accordingly to the longitudinal axis of the animal's body supported by moderate number of the elastic fiber. After skin elongation, random fibers became oriented according to direction of acting force.

## Conclusions

In this investigation the mechanical properties of the skin (cut out in different directions) were characterized through uniaxial tensile testing. Subsequent investigations will be extended to bi- and multiaxial tensile tests and measurements physical parameters with application of Raman spectroscopy [3,4].

The successful correlation of skin mechanical properties with diagnostic picture obtained by spectroscopic methods as well as microscopic and histological research results will allow to determine the skin properties map on the surface of any body part of a patient on the basis of a simple examination which can be conducted in clinical conditions it will also be possible to design an optimum surgical operation course.

## Podziękowania

Praca wykonana w ramach grantu nr N 518 038 31/3666.

## Acknowledgements

This work was supported by grant No. N 518 038 31/3666.

## Piśmiennictwo

- [1] Elsner P., Bererdescs E., Wilhelm K.P., Malibach H.I.: Bioengineering of the skin: Skin Biomechanics. Boca Raton: CRC Press 2002.  
 [2] Fung Y.C.: Biomechanics. Mechanical properties of living tissues. New York: Springer-Verlag, 1981.  
 [3] Laniry Y., Fung Y.C.: Two-dimensional mechanical properties of rabbit skin –I. Experimental system; II. Experimental results. J. Biomechanics Vol.7, 1974.

## References

- [4] Szotek S., Komorowska M., Będziński R., Kobielarz M., Glogowska-Gąsior M., Mączka M., Hanuza J., Pośpieszny N.: Determining the mechanical properties of the skin with taking Raman spectroscopy (in polish). Biocybernetics and Biomedical Engineering. XV National Scientific Conference Wrocław 2007.

## TRANSPORT MASY ZWIĄZANY Z IMPLANTACJĄ BIOCERAMIKI W ZAGADNIENIACH ZESPALANIA TKANKI KOSTNEJ

MARIUSZ WÓJCIK

AKADEMIA GÓRNICZO HUTNICZA  
 WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI  
 AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

### Streszczenie

*W artykule rozważano pewien aspekt transportu masy implantu bioceramicznego w zagadnieniach zespalandia tkanki kostnej dla oceny postępu leczenia i zdrowienia pacjenta i zasugerowano kierunek poszukiwania dla rozwiązania tego problemu. Zaproponowano optymalizację oddziaływania wnikażącej masy implantu w reakcji z tkanką kostną w ujęciu wariacyjnym polegającym na znalezieniu najbardziej optymalnej trajektorii procesu jego wnikania opartej na analizie probabilistycznej, przyjmując pewien rozkład energii typu beta (gaussowskie przybliżenie entropii boltzmanowskiej) i dobierając potencjał opóźniony reakcji chemicznej gwarantujący homogeniczność procesu zespalandia masy wnikażącej z ośrodkiem kostnym. Zaproponowana matematyczna procedura poszukiwania rozwiązania pozwoliła znaleźć różniczkowe równanie opisujące prędkość wnikania masy implantu.*

**Słowa kluczowe:** wszczepianie bioceramiki, transport masy bioceramicznej, rachunek wariacyjny

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008),79-82]

### Wstęp

Wprowadzanie jakiegokolwiek implantu do organizmu żywego w celu naprawy lub uzupełnienia uszkodzonej tkanki kostnej wymaga znajomości chemizmu wiązań pomiędzy tą naturalną tkanką a sztucznym implantem [1,2]. Biorąc pod uwagę tkankę kostną uformowaną zgodnie ze szczegółowymi funkcjami komórek w organizmie widać, że jest to naturalny materiał kompozytowy ze zróżnicowanymi fazami stałymi i ciekłymi, który musi spełnić bardzo wysokie wymagania mechaniczne, a przy tym zapewnić wewnętrzny transport substancji odżywczych i przekazywanie informacji.

## MASS TRANSPORT RELATED WITH BIOCERAMIC IMPLANTATION IN TISSUE OSTEOSYNTHESIS PROBLEMS

MARIUSZ WÓJCIK

AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
 FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS  
 30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

### Abstract

*Some aspect of transportation of a mass of bio ceramic implant in tissue osteosynthesis problems was considered in paper for evaluation of the treatment development and patient convalescence. The searching procedure was also suggested for solution. The optimisation of a response to penetration of an implant mass in reaction with bone tissue in variation approach was proposed basing on probabilistic analysis with reception of the beta energy distribution (Gaussian approximation of the Boltzman's entropy). Homogeneity of an osteosynthesis of a penetrating mass into bone tissue is guaranteed by selection of the dilatory potential of a chemical reaction. Proposed mathematical procedure allows to find differential formula describing the velocity of the penetration of an implant mass.*

**Keywords:** bioceramic implantation, transport of bioceramic mass, calculus of variation

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008),79-82]

### Introduction

Insertion of any implant into living body for reconstruction or completing of the injury bone tissue requires of the knowledge of bonding chemise between natural tissue and an artificial implant [1,2]. Taking into account the bone tissue constituted in accordance with particular functions of cells in the body it is visible that it is a natural composite with differential constant and liquid phases. It must perform very high mechanical requirements with simultaneous assertion of an interior transport of nutritive substances and information transmission.

Bones in human and other mammal bodies is generally classified into two types: cortical bone (osseous), also

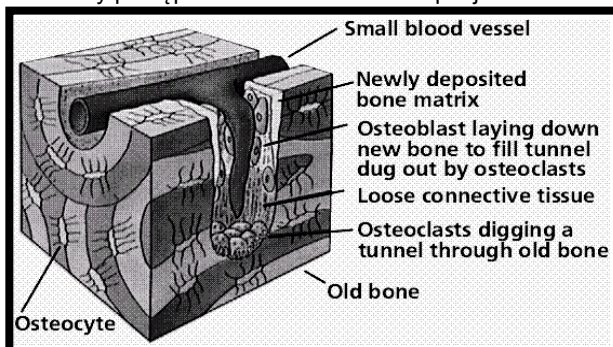
Kości człowieka i innych ssaków są ogólnie klasyfikowane w dwóch typach tkanki kostnej: kości korowe inaczej twarde oraz gąbczaste inaczej miękkie (RYS. 1). Podział związany jest z porowatością i ich mikrostrukturą. Kość korowa jest bardziej zwarta o porowatości od 5 do 10% i występuje w kościach długich i kręgach tworząc zewnętrzną osłonę dla miękkiej tkanki kostnej. Podstawową strukturą kości korowej jest osteon z kanałami Harvers'a. Kości miękkie są bardziej porowate o porowatości od 50 do 90% i znajdują się w końcach kości długich, w kręgach i kościach płaskich miednicy. Podstawową strukturą kości miękkich są krótkie, różnie zorientowane beleczki kostne. Razem tworzą spoiści i wytrzymały naturalny kompozyt [3,4].

Znajomość struktury i właściwości kości są niezbędne podczas procesu ich regeneracji w ognisku złamania. W procesie rozrostu dochodzi do uaktywnienia wszystkich komórek osteogennych z wytworzeniem włóknisto-kostnej kostnicy, która ulegając dalszej przebudowie tworzy kość grubowłóknistą, a następnie blaszkową. Rozrost kości, odbudowa i resorpcja oznaczają ciągłą wymianę materii między krwią a komórkami lub przestrzenią śródmiąższową narządów (RYS.2). Zatem, wprowadzając na przykład bioceramiczny implant w celu uzupełnienia ubytku układu kostnego, dotykamy bardzo ważnego zagadnienia transportu jego masy wchodzącej w reakcję z tkanką kostną.

Bioceramika ze względu na swoje walory ma bardzo szerokie zastosowanie w technice implantacji [5]. Takie cechy jak bardzo dobra biotolerancja, odporność na ścieranie, ściskanie, korozję oraz porowatość sprzyjają wrastaniu tkanek i z powodzeniem zastępują wszczepy kostne. Optymalne wrastanie w strukturę kostną zapewniają pory o wielkości od 100 do 150µm. Zazwyczaj przeszczep kostny zanim zostanie przebudowany ulega resorpcji i traci swoje właściwości podporowe. Wszczep ceramiczny nie podlega tym procesom, a tym samym dobrze spełnia swoje funkcje mechaniczne tworzywa nośnego.

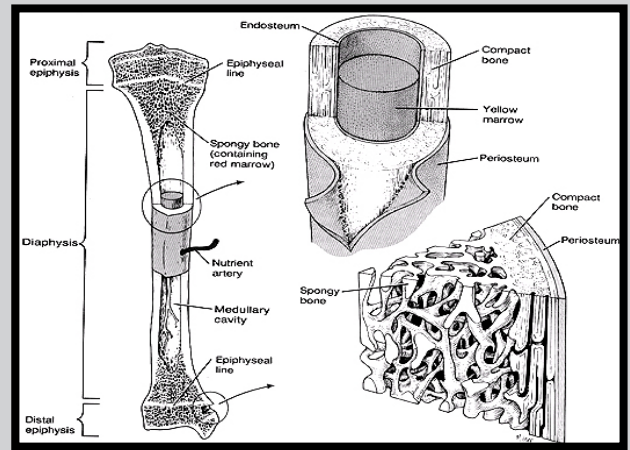
Na potrzeby chirurgii stosuje się głównie materiały ceramiczne resorbowalne w organizmie jak hydroksyapatyt, które biorąc udział w metabolizmie przechodzą do struktur tkankowych [6,7,8,9]. Inne stosowane materiały to materiały z kontrolowaną reaktywnością powierzchniową charakteryzują się tym, że ich powierzchnia wszczepu tworzy z tkankami określone reakcje chemiczne powodujące połączenia substancji organicznych z nieorganicznymi. Są to głównie bioszklka służące do regeneracji w układzie sródkostnym [10,11]. Ostatnią grupę stanowią materiały obojętne dla organizmu takie jak korund i węgiel pirolityczny.

Zastosowanie każdego z tych biomateriałów, różniących się przecież właściwościami tak fizycznymi jak i chemicznymi, wiąże się z zagadnieniem transportu masy implantu wchodzącego w reakcję z tkanką kostną i jest bardzo istotne dla oceny postępu leczenia i zdrowienia pacjenta.



**RYS. 2. Rodzaje tkanki łącznej w strukturze kości** (wg: [www.emc.maricopa](http://www.emc.maricopa)).

**FIG. 2. Type of connective tissue in structure of bone** (from: [www.emc.maricopa.edu](http://www.emc.maricopa.edu)).



**RYS. 1. Struktura kości długich** (wg: [www.lead.ac.uk/chb/lectures](http://www.lead.ac.uk/chb/lectures)).

**FIG. 1. Structure of a long bone** (from: [www.lead.ac.uk/chb/lectures](http://www.lead.ac.uk/chb/lectures)).

known as compact bone and trabecular bone, also known as cancellous or spongy bone tissues (FIG. 1). These two types are classified on the basis of porosity and the unit microstructure. Cortical bone is much denser with porosity ranging between 5% and 10%. Cortical bone is found in the shaft of long bones and forms the outer shell around spongy tissue at the end of joints and the vertebrae. The basic first level structure of cortical bone is osteons. Trabecular bone is much more porous with porosity ranging anywhere from 50 to 90%. It is found in the end of long bones, in vertebrae and in flat bones like the pelvis. Its basic first level structure is the trabeculae. Spongy part consists of short differently oriented trabecular bones whereas cortical ones consist of lamellas and osteons with Harvers' channels. Cortical as well as trabecular bones form coherent and resistant natural composite [3,4].

Knowledge of a structure and properties of bones is essential during remodelling and regeneration process in damage zone. An activation of an all osteogenous cells are made in proliferation process where first fibrous osseous callus is produced and then undergoing further reconstruction forms the thick fibrous bone and finally lamellas ones. Proliferation, reconstruction and resorption mean a continuous exchange of substances between blood and cells or interstitial space of organs (FIG. 2).

Hence, inserting for instant bio ceramic implant with the aim of completing of a defect in bone system we touch very important problems of a transportation of its mass being in a reaction with bone tissue.

Bio ceramic has a very broad application in implantation technique due to its great advantages [5]. Such features as a very good bio tolerance, resistance on abrasion, compression, corrosion and porosity favour in growing into tissue and successfully replaces osseous implants. Optimal growing into bone structure provides pores of 100 to 150µm in size. Usually osseous transplant undergoes resorption and loses its supporting properties before reconstruction. Ceramic transplant does not undergo these processes and the same positively fulfills its mechanical functions as a carry matter.

Ceramic materials as hydroxyapatite that is resorbable in living organism are mainly used in surgery applications [6,7,8,9]. They participate in metabolism processes and are transferred into tissue structures. Other materials with controlled reactivity of a surface such bio glasses for regeneration of intraosseous systems characterize with the ability for chemical reaction with tissues forming junctions between organic and inorganic substances [10,11]. Corundum and

Zagadnienie to można rozważać z punktu widzenia problemów optymalizacji oddziaływania wnikającej masy implantu w reakcji z tkanką kostną w ujęciu wariacyjnym polegającym na znalezieniu najbardziej optymalnej trajektorii procesu jego wnikania opartej na analizie probabilistycznej przyjmując pewien rozkład energii typu beta (gaussowskie przybliżenie entropii Boltzmannowskiej) [12,13,14] dobierając potencjał opóźniony reakcji chemicznej gwarantujący homogeniczność procesu zespalania masy wnikającej z ośrodkiem kostnym. Metoda wariacyjna, stosowana z powodzeniem dla wielu różnych procesów fizycznych i chemicznych [15,16] wydaje się być dobrym opisem dla zjawisk biochemicznych zachodzących w trakcie leczenia na przykład ubytku kości po skomplikowanym złamaniu a następnie zespoleniu kości.

W niniejszym artykule pokazano zastosowanie metody wariacyjnej w procesie chemicznego oddziaływania masy wnikającej z hydroksyapatytu, wyrażającym się określoną postacią potencjału  $\varphi$  reakcji biochemicznej.

### Formalizacja zagadnienia

Dla próby rozwiązania problemu szukamy tych oddziaływań, które w całym procesie wnikania utrzymują stałość oddziaływań, prowadzących do reakcji. W celu analizy problemu rozważmy wariację z beta rozkładu energii  $f=E(1-E)$  jako przybliżenie  $f$  entropii Boltzmana. Mamy wobec tego wariację:

$$d \int_0^T E(1-E) dt \quad (1)$$

gdzie:  $E = \frac{x^2}{2} + j(x; t)$ ,  $\varphi$  - potencjał oddziaływania biochemicznego,

$x(t)$  prędkość.

Programujemy reakcję tak, aby gęstość powierzchniowa procesu była stała:

$$j(x_1, x_2, x_3; t) \equiv j(x, y, z; t)$$

Zatem pozostaje nam analiza procesu wnikania, w którym żądamy:  $\varphi(x, y; z) = \text{const}$  traktowane jako funkcja jednej zmiennej  $z$ . Dostajemy więc z (1) równanie (2) w postaci:

$$d \int_0^t \left( \frac{z^2}{2} + j(x, y; z) \right) dt = 0 \quad (2)$$

czyli dla „Hamiltonianu”:

$$H = \frac{z^2}{2} - \frac{z^4}{4} - \frac{z^2}{2} j + j - \frac{z^2}{2} j - j^2 \quad (3)$$

otrzymujemy równanie Eulera:

$$-z \frac{\partial j}{\partial z} + \frac{\partial j}{\partial z} - 2j \frac{\partial j}{\partial z} - \frac{d}{dt} [z - z^3 - 2j z] = 0 \quad (4)$$

Dla założonej stałości potencjału dostajemy:

$$3z^2 + 2j - 1 = 0 \quad \text{i} \quad z = 0 \quad \text{stąd}$$

$$z(t) = \sqrt{\frac{2j - 1}{3}} t + B \quad (5)$$

Otrzymaliśmy formułę (5) na ruch jednostajny z ujemną prędkością, z której możemy wyznaczyć chwilę  $T$  ustania procesu, w którym  $z(T) = 0$ , czyli:

pyrolytic carbons belong to final group of a neutral material for organism, which is also used in bone surgery.

The usage of any of these bio materials differing with physical as well as chemical properties is connected with problems of transportation of a mass of implants reacting with bone tissue and is very important for an evaluation of the treatment development and patient convalescence.

That problem can be considered from the point of view of an optimization of a response to penetration of an implant mass in reaction with bone tissue in variation approach basing on probabilistic analysis with reception of the beta energy distribution (Gaussian approximation of the Boltzmann's entropy) [12,13,14]. Homogeneity of an osteosynthesis of a penetrating mass into bone tissue is guaranteed by selection of the dilatatory potential of a chemical reaction.

Method of calculus of variation very often used in many physical as well as chemical processes [15,16] seems to be a good description for bio chemical phenomena becoming during convalescence of patient after bone looses due to complicated fracture and next tissue osteosynthesis.

The application of calculus of variation and the consideration on chemical response to penetration of an implant of hydroxyapatite expressed in define formula of potential  $\varphi$  of bio chemical reaction was presented in this paper.

### Main result

To find a solution of the problem we are trying to search such reactions that are constant in whole process of an implant penetration. Let's consider variation from beta energy distribution  $f=E(1-E)$  as an approximation  $f$  of the Boltzmann's entropy. We obtain the following variation:

$$d \int_0^T E(1-E) dt \quad (1)$$

Where:  $E = \frac{x^2}{2} + j(x; t)$ ,  $\varphi$  - potential of biochemical reaction,  
 $x(t)$  - velocity.

We programme the reaction in such a way that the surface density will be constant:

$$j(x_1, x_2, x_3; t) \equiv j(x, y, z; t)$$

Hence we have to analyse the penetration process where we require the following:  $\varphi(x, y; z) = \text{constant}$ , that is treated as a function with one variable  $z$ .

We obtain from (1) equation (2) in the form:

$$d \int_0^t \left( \frac{z^2}{2} + j(x, y; z) \right) dt = 0 \quad (2)$$

and for „Hamiltonian”:

$$H = \frac{z^2}{2} - \frac{z^4}{4} - \frac{z^2}{2} j + j - \frac{z^2}{2} j - j^2 \quad (3)$$

we obtain Euler's equation:

$$-z \frac{\partial j}{\partial z} + \frac{\partial j}{\partial z} - 2j \frac{\partial j}{\partial z} - \frac{d}{dt} [z - z^3 - 2j z] = 0 \quad (4)$$

For assumed constancy of a potential  $\varphi$  we obtain:

$$3z^2 + 2j - 1 = 0 \quad \text{and} \quad z = 0 \quad \text{then}$$

$$z(t) = \sqrt{\frac{2j - 1}{3}} t + B \quad (5)$$



$$T = -\frac{B\sqrt{3}}{\sqrt{2j} - 1} \quad (6)$$

Widzimy, że potencjał moderuje głębokość wnikania masy implantu do momentu ustania reakcji biochemicznej. Rozpoznanie ruchu cząstek daje nam pole prędkości we współrzędnych Lagrange'a. Znając kształt pola prędkości możemy poprzez równanie ciągłości znaleźć pole gęstości. Powstaje też problem utrzymania w przybliżeniu stałej gęstości wnikającego medium zgodnego z gęstością kości (tutaj w osi z), a zatem spełnienia wspomnianego równania ciągłości:

$$\frac{\partial r}{\partial t} + \text{div}(r v) = 0 \quad (7)$$

gdzie:

$\rho$  - gęstość materiału,  $v$  - prędkość procesu

W naszym przypadku mamy następujący związek pomiędzy gęstością zrostu kostnego i szybkością jego powstawania:

$$\frac{\partial r}{\partial t} + r \frac{\partial v}{\partial z} + v \frac{\partial r}{\partial z} = 0 \quad (8)$$

Równanie to opisuje zatem kinetykę i strukturę powstającego nowego obiektu kostnego, dlatego też w następnej kolejności musimy zadbać o odpowiedni kształt opóźnionego potencjału reakcji biochemicznej na drodze  $z(t)$ . Ostatecznym celem pracy będzie znalezienie właściwego potencjału oddziaływania materiału implantowanego, który zapewni jego jednorodne lokalne wnikanie w lokalną przestrzeń ubytku kostnego. Procedura ta będzie już wymagała odpowiedniego podejścia numerycznego.

## Podsumowanie

Zaprezentowany kierunek poszukiwania szybkości wnikania masy implantu hydroksyapatytowego umożliwia szerszy wgląd w problematykę stosowania tego typu materiałów pomocniczych w operacjach chirurgicznych, mając na celu ocenę postępu leczenia i troskę zdrowienia pacjenta. Wnioski płynące z formalizmu ujawniają związek prędkości reakcji odbudowującej kości z zewnętrznym czy wewnętrznym potencjałem reakcji biochemicznej.

We obtain a formula (5) for constant movement with negative velocity from whom we can calculate moment  $T$  for ending of the process where  $z(T) = 0$ , then:

$$T = -\frac{B\sqrt{3}}{\sqrt{2j} - 1} \quad (6)$$

As we can see, the potential  $\varphi$  moderates the deep of a penetration of an implant. Recognition of the movement of particles gives the velocity field in Lagrange's co-ordinates. Knowing its shape it is possible to find the density field solving the continuity equation.

There is also other question of stabilization the constant density of the penetrating medium that is approximately consistent with the bone density (here in  $z$  axis), and then fulfilling the following continuity equation:

$$\frac{\partial r}{\partial t} + \text{div}(r v) = 0 \quad (7)$$

where:  $\rho$ -density,  $v$ - velocity

In our case we have the relationship between a density of the bone adhesion and velocity of its grow up:

$$\frac{\partial r}{\partial t} + r \frac{\partial v}{\partial z} + v \frac{\partial r}{\partial z} = 0 \quad (8)$$

Equation (8) describe the kinetic and the structure of a new remodelled bone object, so we have to take care of a suitable form of the dilatatory potential  $\varphi$  of a biochemical reaction running on the way  $z(t)$ .

The final aim of the work will be the searches of the suitable reaction of implant that provide it uniform local penetration into the space of bone lost. Such procedure will already needs the numerical approach.

## Summary

Presented direction of a searching of the velocity of penetration of hydroxyapatite implant makes the broader possibility into inspection the problems of an application such help materials in surgery treatments to achieve an assessment for evaluation of the treatment development and patient convalescence.

Concluding we reveal the relationship between the velocity of the reaction of remodelling bones with outer or inner potential of the biochemical reaction.

## Piśmiennictwo

- [1] Tofail S.A.M., Wojcik M., What drives bone growth?, Engineering of biomaterials, No 58-60, p.251-254, 2006.
- [2] Kasemo B., Lausmaa J., Surface science aspects on organic biomaterials, CRC Crit. Rev.Biocomp.,2, 335, 1986.
- [3] Evans F.G., Mechanical properties of bone, Ed.C.Thomas, Springfield 1973.
- [4] Weiner S. Traum W., Bone structure: from angstrom to microns, The FASEB Journal, 6: 879-885, 1992.
- [5] Marciniak J., Biomateriały w chirurgii kostnej, Gliwice 1992
- [6] Ślósarczyk A., Piekarczyk J., Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. Ceramics International, 25(6), p.561-565, 1999.
- [7] Tadic D., Beckmann F. Schwarz K., Epple M., A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering, Biomaterials 25 (2004).
- [8] Szafran M., Bobryk E., Bereza M., Parzuchowski P., Kompozyty ceramiczno-polimerowe na bazie porowatego hydroksyapatytu i makromonomerów laktydowo-węglanowych, Engineering of Biomaterials, No 38-42, p.150-154, 2004.

## References

- [9] Ozgur E.N., Cuneyt T.A., Preparation of Porous  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  and  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Bioceramics, J.Am.Ceramic.Soc.,83 ,7,2000.
- [10] Szarska S., Niemczyk S., Ładunek powierzchniowy indukowany na bioaktywnych kompozytach, Engineering of Biomaterials, No 58-60, p.248-250, 2006.
- [11] Kokoszka J., Onyszkiewicz A., Szymańska K., Bramowska K.J., Cholewa-Kowalska K., Ślósarczyk A., Łączka M., New generation bioglass as a component of hydroxyapatite composite, Engineering of Biomaterials, 73, 18-20, 2008.
- [12] Wojcik M., Steering of a new magnetic properties of carbon fibres composites, International Conference on Fine Particle Magnetism, ICFPM-2007, Rome.
- [13] Wojcik M., Analysis of a dependence of the strength of carbon fibre from the magnetic nanostructure, Karbo, 4, 2007.
- [14] Wojcik M., Hui D., Modelling of the process of changing of nano structure of modified polymer fibres by diffusion, Proceedings of ICCE-12, Tenerife, 2005.
- [15] Gelfand I.M., Fomin S.W, Rachunek wariacyjny. PWN, Warszawa, 1975.
- [16] Elsgolc L.E., Variacionnyje isczislenia, Moskwa, 1956.

# WPLÝW BIOMATERIAŁÓW NA PRZYLEGANIE I AKTYWNOŚĆ MYSICH FIBROBLASTÓW L929

ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>,  
BARBARA PŁYTYCZ<sup>3</sup>, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO,  
KATEDRA FIZJOTERAPII, ZAKŁAD ANATOMII, KRAKÓW, POLSKA

<sup>2</sup>AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW, POLSKA

<sup>3</sup>UNIwersYTET JagIELŁoński, INSTYTUT ZOOLOGII,  
ZAKŁAD IMMUNOBIOLOGII EWOLUCYJNEJ, KRAKÓW, POLSKA

*[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 83-86]*

## Wstęp

Trudności z pozyskaniem wystarczającej liczby narządów do przeszczepów stanowią silną motywację do rozwoju inżynierii biomateriałów zajmującej się wytwarzaniem biogodnych materiałów implantacyjnych. Wprowadzenie tych materiałów do organizmu żywego ma na celu zastąpienie, przywrócenie lub podtrzymanie funkcji tkanek uszkodzonych w wyniku urazu lub choroby [1,2]. W ostatnich latach duże nadzieje wiąże się z inżynierią tkankową, która wymaga opracowania nowych rozwiązań materiałowych opartych na materiałach resorbowalnych. Jedną z grup związków potencjalnie przydatnych dla celów inżynierii tkankowej są syntetyczne polimery resorbowalne takie jak: kopolimer glikolidu i L-laktydu (PGLA), terpolimer glikolidu, L-laktydu i ε-kaprolaktonu (PGLCap) oraz kopolimer glikolidu i ε-kaprolaktonu (PGCap). Pierwszym krokiem w ocenie wartości tych biomateriałów jest badanie ich biogodności i cytotoxyczności. Do tego typu badań najczęściej wykorzystuje się linie komórkowe, bądź hodowle pierwotne różnego typu komórek. Bada się ich zmiany morfologiczne mogące wynikać z uszkodzenia wskutek bezpośredniego kontaktu z biomateriałem, jak również ich aktywność komórkową.

Celem niniejszej pracy było zbadanie in vitro wpływu resorbowalnych podłoży polimerowych PGLA, PGLCap oraz PGCap na przyleganie i aktywność wydzielniczą mysich fibroblastów L929 w 5 dniu hodowli komórek.

## Materiały i metody

Kopolimeryzację glikolidu z L-laktydem (PGLA), teropolimeryzację glikolidu z L-laktydem i ε-kaprolaktonem (PGLCap) oraz kopolimeryzację glikolidu z ε-kaprolaktonem (PGCap) prowadzono w stopie w temperaturze 100-110°C wykorzystując jako inicjator acetyloacetonian cyrkonu Zr(Acac)<sub>4</sub>. PGLA (Mn=44kDa, d=2.5) to wynik polimeryzacji glikolidu i L-laktydu w stosunku molowym 18:85. PGLCap (Mn=48kDa, d=1.9) otrzymano w wyniku teropolimeryzacji glikolidu, L-laktydu i ε-kaprolaktonu w stosunku molowym 11:70:20. PGCap (Mn=53 kDa, d=1.8) to kopolimer glikolidu i ε-kaprolaktonu w stosunku molowym 10:90 [3]. Syntezę polimerów przeprowadzono w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, PAN w Zabrze.

W celu otrzymania folii otrzymane polimery rozpuszczano w chlorku metylenu (POCH, Gliwice), przygotowując roztwory 10%, które odlewano na szklanych szalkach Petriego. Rozpuszczalnik odpędzano w powietrzu w temperaturze pokojowej, a później w suszarce próżniowej w temperaturze 30°C przez 2 dni. Z otrzymanych folii wycinano krążki o średnicy 12 mm.

# EFFECTS OF BIOMATERIALS ON ADHESION AND ACTIVITY OF MURINE FIBROBLASTS L929

ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>1</sup>, ELŻBIETA PAMUŁA<sup>2</sup>,  
BARBARA PŁYTYCZ<sup>3</sup>, ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION,  
FACULTY OF ANATOMY, CRACOW, POLAND

<sup>2</sup>AGH - UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,  
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, CRACOW, POLAND

<sup>3</sup>JAGIELLONIAN UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EVOLUTIONARY  
IMMUNOBIOLOGY, INSTITUTE OF ZOOLOGY, CRACOW, POLAND

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 83-86]*

## Introduction

Difficulties in acquiring sufficient numbers of organs for transplantation stimulate progress in biomedical engineering and in particular in biocompatible material development. The purpose for introducing such biomaterials into living organisms is to substitute, restore or maintain functions of tissues damaged by injury or disease [1,2]. Recently great expectations are laid on tissue engineering that requires development of new biodegradable materials. One group of biodegradable materials potentially useful for tissue engineering constitute synthetic polymers including copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA), terpolymer of glycolide, L-lactide and ε-caprolactone (PGLCap) and copolymer of glycolide ε-caprolactone (PGCap). Critical factors that must be resolved while evaluating usefulness of the biomaterials are their biocompatibility and cytotoxicity. For such evaluations immortalized cell lines or primary cell cultures of different cell types are commonly used. The studies allow for testing of morphological changes of the cells due to damage resulting from direct contact with biomaterials, and for testing of cell activity.

The aim of the current study was to test in vitro influence of degradable polymers PGLA, PGLCap and PGCap on adherence and activity of murine fibroblasts L929 after 5 days of co-culture.

## Materials and methods

Copolymerization of glycolide and L-lactide (PGLA), terpolymerization of glycolide, L-lactide and ε-caprolactone (PGLCap) and copolymerization of glycolide and ε-caprolactone (PGCap) were performed in bulk at 100-110°C with the use of zirconium acetylacetonate Zr(Acac)<sub>4</sub> as an initiator. PGLA (Mn=44kDa, d=2.5) is a result of copolymerization of glycolide and L-lactide with the molar ratio of the co-monomers of 18:85. PGLCap (Mn=48kDa, d=1.9) was obtained by terpolymerization of glycolide, L-lactide and ε-caprolactone with the molar ratio of the co-monomers of 11:70:20. PGCap (Mn=53 kDa, d=1.8) is a copolymer of glycolide and ε-caprolactone with the molar ratio of the co-monomers of 10:90 [3]. Synthesis of the polymers was done at the Center of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Sciences in Zabrze.

To obtain the foils the polymers were dissolved in methylene chloride (POCH, Gliwice) at a concentration of 10% (w/v) and slip cast on glass Petri dishes. The solvent was evaporated in air at room temperature, followed by vacuum treatment in the vacuum oven at 30°C for 3 days. Circles having the diameter of 12mm were then cut out of the resulting foils.

Biomateriały i szkiełka nakrywkowe sterylizowano zanurzając je w 70% etanolu (POCh, Polska), a następnie naświetlając promieniowaniem UV przez 45 minut każdą stronę biomateriału i szkiełka. Następnie krążki umieszczano w 24 dołkowej płytce hodowlanej (Nunc, Dania).

Do badań użyto linię komórkową mysich fibroblastów tkanki łącznej L929. Komórki hodowane były w plastikowych butelkach (Nunc, Dania) o pojemności 75ml w pożywce hodowlanej DMEM z glukozą i L-Glutaminą (PAA, Austria) z dodatkiem 10% płodowej surowicy cielęcej (PAA, Austria) oraz 5% roztworu antybiotyków: penicyliny - 10UI/ml, streptomycyny - 10mg/ml, (Sigma-Aldrich, Niemcy) w inkubatorze (Nuair, USA) zachowując temperaturę 37°C i stężenie CO<sub>2</sub> na poziomie 5%. Co 2-3 dni, kiedy komórki osiągały stan konfluencji, pasażowano je, przeprowadzając trypsynizację (0,25% roztwór trypsyny; Sigma-Aldrich, Niemcy). Do badań użyto komórki z pasażu od 7-10. Komórki były zliczane w hemocytometrze Burkera i doprowadzane do stężenia 3x10<sup>4</sup> kom/ml, po czym umieszczano je w studzienkach 24-dołkowej płytki hodowlanej (Nunc, Dania) zawierających krążki badanych biomateriałów lub okrągłe szkiełka nakrywkowe jako kontrolę. W takich warunkach komórki hodowano przez 5 dni. Morfologię komórek przylegających do podłoża obserwowano w mikroskopie odwróconym (Jenamed, Niemcy).

Zdolność komórek do przylegania badano wykorzystując test wchłaniania fioletu krystalicznego. Komórki przylegające do podłoża utrwalano w 2% paraformaldehydzie przez 1 h, a następnie barwiono fioletem krystalicznym (CV; 0,5% w 20% metanolu, 5min) (POCh, Gliwice). Po upływie tego czasu, próbki przepłukiwano wodą i przenoszono do nowej 24 dołkowej płytki hodowlanej. Po wyschnięciu ekstrahowano zaabsorbowany barwnik dodając do każdego dołka 1ml 100% metanolu (POCh, Gliwice). Następnie mierzono gęstość optyczną (O.D.) przy długości fali 570nm za pomocą spektrofotometru Export Plus (Asys Hitach, Austria). Ponieważ polimery chłoną fiolet krystaliczny, dodatkową kontrolę stanowiły dołki zawierające biomateriały i pożywkę hodowlaną niezawierającą komórek [3].

Analizę aktywności fibroblastów przeprowadzono metodą Griessa polegającą na pomiarze poziomu tlenu azotu (NO) w nadsączach znad hodowli komórek. Do studzienek 96 dołkowej płytki przeniesiono 100 µl nadsącza znad komórek i dodano 100 µl mieszaniny odczynników Griessa A i B w stosunku 1:1 (A: 1% sulfamid w 5% kwasie fosforanowym, B: 0,1% naftylenediamina w H<sub>2</sub>O; oba z Sigma-Aldrich, Niemcy). Po 5 minutach mierzono absorbancję spektrofotometrem Export Plus (Asys Hitach, Austria) przy długości fali 540nm [3].

Poziom białka w nadsączach znad hodowli komórek mierzono metodą kolorymetryczną BCA. Sporządzono mieszaninę CS (II) (siarczan miedzi II; Sigma-Aldrich, Niemcy) i BCA (kwas bis-cynchoninowy; Sigma-Aldrich, Niemcy) w stosunku 1:50. Do studzienek 96 dołkowej płytki przeniesiono po 10µl badanych próbek, a następnie do każdego dołka dodano po 200µl przygotowanej mieszaniny CS/BCA. Płytki inkubowano w ciemności przez 30 minut. Po tym czasie mierzono absorbancję przy długości fali 570nm przy użyciu spektrofotometru Export Plus (Asys Hitach, Austria) [4].

Analizę statystyczną wykonano przy pomocy testu T-Tukeya. Na wykresach przedstawiono średnią arytmetyczną ± SE (błąd średni).

## Wyniki i dyskusja

W 5 dniu hodowli fibroblasty hodowane bez obecności biomateriałów (dołki kontrolne) silnie przylegały do podłoża, były rozplaszczane i miały wiele wypustek cytoplazmatycz-

For cell culture studies the polymeric foils and control glass cover slips were washed in 70% ethanol, sterilized with UV irradiation (45min for each side) and placed at the bottom of 24-well dishes (Nunc, Dania).

The fibroblast cell line L929 of mouse origin was used in the studies. The cells were cultured in 75-ml plastic bottles (Nunc, Denmark) in DMEM culture medium enriched with glucose, L-Glutamine (PAA, Austria), 10% foetal bovine serum (PAA, Austria) and 5 % antibiotic solution (Sigma, Germany) containing penicillin (10UI/ml) and streptomycin (10 mg/ml). The cells were cultured in the incubator (Nuair, USA) at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>.

Every 2-3 days, when the cells were forming high confluence monolayers, the cell cultures were passaged by trypsinization (0.25% solution of trypsin; Sigma, Germany). The cells that were harvested after 7 to 10 passages were used in the further studies. They were counted in Burkert's hemocytometer and diluted to 3x10<sup>4</sup> cell/ml, and thereafter they were introduced into the wells of 24-well culture dishes (Nunc, Denmark) containing discs of tested biomaterials or rounded glass cover slips (controls). In such conditions the cells were cultured for 5 days. Subsequently, morphology of the cells adhering to the polymeric foils or control glass was observed under an inverted microscope (Jenamed, Germany).

The ability of the cells to adhere to glass/polymeric surfaces was tested using the crystal violet test (CV). The cells adhering to the foils or glass were fixed with 2% paraformaldehyde for 1 hour, and then stained with crystal violet (CV; 0.5% in 20% methanol, 5 min.). After that time the foils and glass cover slips were washed with water and transferred to a new 24-well culture plate. After drying, the absorbed dye was extracted by addition of 1ml of 100% methanol (POCh, Gliwice) to every well. After that, the optical density (O.D.) was measured at 570 nm with the Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria). Since the polymers absorb some crystal violet, additional controls were run. These were containing biomaterials and cell-free medium only [3,4].

Fibroblast activity was evaluated by the Griess method that allows for measurement of nitric oxide (NO) concentration in supernatants collected from cell cultures. Firstly 100 µl of the supernatant was added to wells of a 96-well plate and then 100µl of a mixture of Griess reagent A and B (1:1) was added (A: 1% sulfamid in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, B: 0.1% naftylenediamine in H<sub>2</sub>O; Sigma-Aldrich, Germany). After 5-minute incubation the optical density was measured at 570nm with spectrophotometer Expert Plus (Asys Hitach, Austria) [3,4].

Protein concentration in the supernatants collected from cell cultures was measured by the colorimetric BCA method. A mixture of copper (II) sulfate solution (CS, Sigma, Germany) and bicinchoninic acid solution (BCA; Sigma, Germany) in the ratio of 1:50 was firstly prepared. Subsequently, 10µl of each tested sample was transferred to wells of a 96-well plate and then 200µl of the CS/BCA mixture was added. The plates were incubated for 30 minutes in the dark. After that time the optical density was measured at 570nm with Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitach, Austria) [5].

T-Tukey test was used for statistical analysis. All values are reported as means ± SE.

## Results and discussion

At the 5<sup>th</sup> day of incubation the fibroblasts cultured without biomaterials (control wells) were strongly adhering to the glass surface, they were flattened and with numerous pseu-

nych (RYS. 1A). Z kolei w przypadku fibroblastów hodowanych z PGLA zaobserwowano większą liczbę komórek w porównaniu z kontrolą. Ponadto komórki wykazywały niemal 100% konfluencję, silnie przylegały do podłoża i były rozplaszczzone (RYS. 1B). Znacznie mniejszą liczbę słabo rozplaszczonych fibroblastów, zaobserwowano w hodowli z PGLCap (RYS. 1C). W przypadku hodowli fibroblastów z PGCap nie udało się mikroskopowo zaobserwować obecności komórek, co wynikało z nieprzejrzystości biomateriału (RYS. 1D).

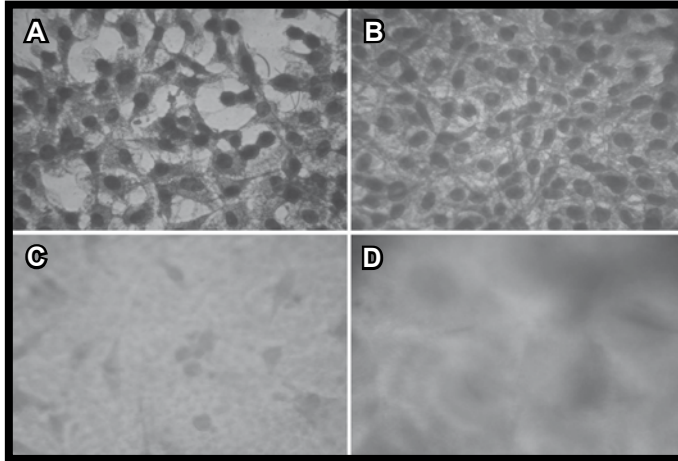
Zaobserwowano także różnice statystycznie istotne w zdolności do przylegania fibroblastów do podłoża pod wpływem ich inkubacji z biomateriałami (RYS. 2). Stwierdzono bowiem, że najwięcej komórek, więcej niż w kontroli przylegało do biomateriału PGLA, podczas gdy w przypadku komórek hodowanych na polimerach PGLCap i PGCap zaobserwowano istotne obniżenie przylegania komórek w stosunku do podłoża kontrolnych (RYS. 2). Wyniki te wskazują, że podłoża zawierające  $\epsilon$ -kapolaktan (PGLCap i PGCap) obniżyły w bardzo istotny sposób zdolność fibroblastów do przylegania do podłoża. Ponieważ fibroblasty linii L929 są komórkami, które w przypadku oderwania od

podłoża nie są zdolne do prawidłowego wzrostu i podziałów [5] wyniki te sugerują, że biomateriały PGLCap i PGCap mogą powodować śmiertelność fibroblastów. Wstępne badania dotyczące wpływu tych dwóch biomateriałów na indukcję śmierci apoptotycznej i nekrotycznej fibroblastów potwierdzają tę hipotezę [Ścisłowska-Czarnecka i wsp. w przygotowaniu].

Z kolei hodowla fibroblastów z badanymi biomateriałami nie wpłynęła na produkcję tlenku azotu (NO) (RYS. 3). Jednak, ponieważ liczba przylegających fibroblastów zmalała w obecności PGLCap i PGCap, uzyskane wyniki mogą świadczyć o wzroście produkcji NO przez komórki hodowane na tych podłożach. Tlenek azotu jest jedną z aktywnych form tlenu, tak więc wzrost jego produkcji może powodować efekt cytotoksyczny w stosunku do otaczających go komórek i tkanek [6], odzwierciedlony w zmniejszonym przyleganiu komórek do podłoża (RYS. 2).

Hodowla fibroblastów z biomateriałami miała także wpływ na produkcję białek przez te komórki (RYS. 4). Fibroblasty hodowane na podłożach PGLA wydzielają do nadśladu podobną ilość białka jak komórki hodowane na podłożach kontrolnych. Natomiast w przypadku komórek hodowanych na biomateriałach PGLCap i PGCap ilość białka wydzielanego przez komórki była istotnie obniżona w stosunku do kontroli, co mogło być spowodowane spadkiem żywotności fibroblastów hodowanych na wyżej wymienionych biomateriałach (RYS. 2). Wśród białek wydzielanych przez fibroblasty w warunkach fizjologicznych znajdują się czynniki wzrostu (np. FGF: czynnik wzrostu fibroblastów) niezbędne do stymulacji procesów metabolicznych i podziałów tych komórek [7]. Dlatego też dodatkowo obniżone wydzielanie białek przez fibroblasty hodowane w obecności PGLCap i PGCap mogło być przyczyną zmniejszonej żywotności tych komórek.

dopodia (FIG. 1A). When the fibroblasts were cultured with PGLA more cells were detected than in biomaterial-free co-cultures. Moreover, almost 100% confluence of fibroblasts was observed in the presence of PGLA and the cells were flat and strongly adherent (FIG. 1B). In contrast, incubation of the fibroblasts with PGLCap resulted in significantly less flattened (round) cells (FIG. 1C). In co-cultures of the cells with PGCap no cells were visible under the inverted microscope, most probably due to poor transparency of the biomaterial (FIG. 1D).



**RYS. 1. Morfologia fibroblastów hodowanych przez 5 dni na szkiełkach kontrolnych (A) lub podłożach polimerowych: PGLA (B), PGLCap (C), PGCap (D). Obserwacje w mikroskopie świetlnym.**

**FIG. 1. Morphology of fibroblasts cultured for 5 days on control glass (A) or polymers PGLA (B), PGLCap (C), PGCap (D). Light microscopy analysis.**

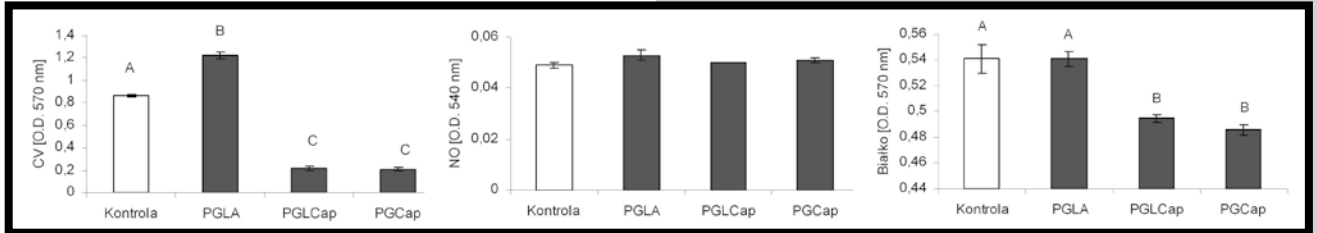
Significant differences between control glass and biomaterials were also observed when fibroblast ability to adhere to their surfaces was tested (FIG. 2). Highest numbers of adherent cell were detected in wells in which fibroblasts were co-cultured with PGLA and in this case there were more adherent cells than in the glass controls. On the contrary, in the cell co-cultures with PGLCap and PGCap significantly less adhering cells were observed (FIG. 2). The above results indicate that biomaterials containing  $\epsilon$ -caprolactone (PGLCap and PGCap) significantly reduced ability of fibroblasts to adhere to their surfaces. Fibroblasts of the cell line L929 are characterized by their adherence

to culture surface(s) and this feature is required for their normal growth and cell division [6]. For that reason the obtained results imply that PGLCap and PGCap might cause death of fibroblasts. Our preliminary studies aimed to verify an impact of the above biomaterials on apoptotic and necrotic death of fibroblasts seem to confirm this hypothesis [Ścisłowska-Czarnecka et al., in preparation].

In contrast, culturing of fibroblast did not alter nitric oxide (NO) production by the cells (FIG. 3). However, as the numbers of adhering fibroblasts were decreased by their co-culture with PGLCap and PGCap (FIG. 2) the results indirectly indicate that in fact NO production (per cell) increased in the case of those biomaterials. Nitric oxide is one of active nitrogen oxides thus increase of its production/release might lead to a cytotoxic reaction towards surrounding cells and tissues [7] reflected here by the decreased surface adherence of the cells.

Incubation of fibroblasts with biomaterials had also an impact on protein release by those cells (FIG. 4). Fibroblasts co-cultured with PGLA released similar levels of proteins as the cells cultured on the control glass. However, when the cells were incubated with PGLCap or PGCap significantly less proteins were detected in the supernatants collected from the co-cultures and this could be related to lowered viability of fibroblasts cultured on the two polymers (FIG. 2). The proteins released by fibroblasts in physiological conditions consist of growth factors (e.g. FGF, fibroblast growth factor) necessary for normal metabolic processes and mitosis of the cells [8]. Therefore, diminished protein release by fibroblasts incubated with PGLCap and PGCap could lead to decreased viability of those cells.

In conclusion, due to different physico-chemical characteristics, the tested polymers had various impact on morphology, adherence and activity of L929 fibroblasts.



**RYS. 2. Zdolność do przylegania fibroblastów L929 hodowanych przez 5 dni na szkiełkach kontrolnych lub podłożach polimerowych: PGLA, PGLCap oraz PGCap. O.D.- gęstość optyczna mierzona przy długości fali 570nm. Istotność statystyczna w stosunku do kontroli: B –  $p < 0,05$ , C –  $p < 0,005$  wg testu T-Tukeya.**

**FIG. 2. Ability of murine fibroblasts L929 to adhere to analysed surfaces after 5 days of culture on either control glass (Kontrola) or polymers PGLA, PGLCap and PGCap. O.D. - optical density measured at 570nm. Mean values  $\pm$  SE. Letters (e.g. B, C) indicate statistical significance from the control group (A) according to T-Tukey's test: B:  $p < 0.05$ , C:  $p < 0.005$ .**

**RYS. 3. Poziom tlenu azotu (NO) w nadsączach znad fibroblastów L929 w 5 dniu hodowli na szkiełkach kontrolnych i podłożach polimerowych: PGLA, PGLCap oraz PGCap. O.D.- gęstość optyczna mierzona przy długości fali 570nm. Brak istotności statystycznej wg testu T-Tukeya.**

**FIG. 3. Nitric oxide (NO) levels in supernatants collected from fibroblast L929 cultures after 5 days on either control glass (Kontrola) or polymers PGLA, PGLCap and PGCap. O.D. - optical density measured at 570nm. Mean values  $\pm$  SE. No significant differences among experimental groups were found by T-Tukey's test.**

**RYS. 4. Poziom białka w nadsączach znad fibroblastów L929 w 5 dniu hodowli na szkiełkach kontrolnych i podłożach polimerowych: PGLA, PGLCap oraz PGCap. O.D.- gęstość optyczna mierzona przy długości fali 570nm. Litera B oznacza istotność statystyczną w stosunku do kontroli:  $p < 0,05$  wg testu T-Tukeya.**

**FIG. 4. Protein concentration in supernatants collected from fibroblast L929 cultures after 5 days on either control glass (Kontrola) or polymers PGLA, PGLCap and PGCap. O.D. - optical density measured at 570nm. Mean values  $\pm$  SE. Letter (B) indicates statistical significance from the control group (A) according to T-Tukey's test:  $p < 0.05$ .**

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowane polimery w różny sposób wpływają na morfologię, przyleganie oraz aktywność fibroblastów, w zależności od składu i właściwości fizyko-chemicznych zastosowanych biomateriałów. Podłoża najgorzej tolerowane przez fibroblasty (PGLCap, PGCap) zawierają  $\epsilon$ -kapolakton, który być może jest odpowiedzialny za negatywny efekt obserwowany w 5 dniu hodowli fibroblastów. Najbardziej obiecującym podłożem do wykorzystania w przyszłości w medycynie wydaje się być PGLA, ponieważ nie wpływa on negatywnie ani na morfologię ani na aktywność, przynajmniej w badanym zakresie, analizowanych komórek.

## Podziękowania

Praca była finansowana z projektu badań własnych – BW nr 215/KF/2007 Akademii Wychowania Fizycznego. Autorki dziękują Panu dr. inż. Piotrowi Dobrzyńskiemu (CMPiW, PAN, Zabrze) za dostarczenie próbek materiałów polimerowych.

The two polymers, PGLCap and PGCap, that turned out to be worse tolerated by the cells, contain  $\epsilon$ -caprolactone that might be responsible for the negative side-effects detected after 5 days of fibroblast co-culture with the polymers. The most promising seems to be PGLA as it changes neither morphology nor activity of fibroblasts, at least when the two parameters were evaluated by the applied methods.

## Acknowledgements

This study was supported by the research grant No. 215/KF/2007 from the Academy of Physical Education, Krakow (Poland). The authors thank Dr. Piotr Dobrzyński (CMPiW, PAN, Zabrze) for providing the polymer samples.

## Piśmiennictwo

- [1] M. Nałęcz. Biomateriały polimerowe. W: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna (red. Błażewicz S., Stoch L.), Akademicka Oficyna Wydawnicza Exit, Warszawa 2003, 257-319.
- [2] E. Pamuła, J. Buczyńska, E. Menaszek, L.D. Bacakova, P. Dobrzyński, M. Bero. Resorbowalne porowate podłoża polimerowe dla inżynierii tkankowej. Chemik 2005, 48, 57-62.
- [3] E. Pamuła, P. Dobrzyński, B. Szot, M. Krętek, J. Krawciów, B. Płytycz, M. Chadzińska, Cytocompatibility of aliphatic polyesters – in vitro study on fibroblasts and macrophages, J Biomed Mater Res A 2008 Jan 9. [Epub ahead of print].
- [4] B. Płytycz, M. Chadzińska. Hodowla tkanek w immunologii. W: Hodowla komórek i tkanek (red. Stokłosowa S.) Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 2004, 187-216.

## References

- [5] E. Kołaczowska, A. Ścisłowska-Czarnecka, M. Chadzińska, B. Płytycz, G. Opdenakker, B. Arnold. Enhanced early vascular permeability in gelatinase B (MMP-9) deficient mice: putative contribution of COX-1-derived PGE2 of macrophage origin. J Leukoc Biol 2006, 80, 125-32.
- [6] T. Das, T.K. Maiti, S. Chakraborty. Traction force microscopy on-chip: shear deformation of fibroblast cells. Lab Chip 2008, 8, 1308-18.
- [7] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 2007, 87, 315-424.
- [8] D.M. Ornitz, N. Itoh. Fibroblast growth factors. Genome Biol 2001, 2, 3005.13005.12.

# WPLYW CHROPOWATOŚCI PODŁOŻA NA TOPOGRAFIĘ WARSTW $TiO_2$ I $SiO_2$ NAKŁADA- NYCH METODĄ ZOL-ŻEL

R. BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>, J. FILIPIAK<sup>1</sup>, C. PEZOWICZ<sup>1</sup>, J. KRZAK-ROŚ<sup>2</sup>,  
M. KOWALSKI<sup>3</sup>

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,

<sup>1</sup> INSTYTUT KONSTRUKCJI EKSPLOATACJI MASZYN

<sup>2</sup> INSTYTUT MATERIAŁOZNAWSTWA I MECHANIKI TECHNICZNEJ

<sup>3</sup> INSTYTUT TECHNOLOGII MASZYN I AUTOMATYZACJI

[*Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 87-89*]

## Wprowadzenie

We współczesnej ortopedii powszechnie stosowane są różnego typu implanty zastępujące zużyte lub uszkodzone części układu kostno-stawowego. Do wytwarzania implantów wykorzystuje się szereg materiałów konstrukcyjnych spełniających odpowiednie wymagania. Liczną grupę stanowią materiały metaliczne: stale austenityczne, stopy Co-Cr, stopy Ni-Cr oraz stopy tytanu. W przypadku implantów, które funkcjonują w środowisku organizmu żywego przez dłuższy okres czasu, liczony w latach, istotne są takie cechy jak: biotolerancja, odporność na oddziaływanie środowiska tkankowego oraz biomechaniczne dopasowanie. W największym stopniu stawiane wymagania spełniają stopy Ti. Pozostałe spośród wymienionych materiałów metalicznych wykazują słabszą odporność korozyjną, co ogranicza zastosowanie tych materiałów głównie na implanty do krótkotrwałego (do kilku miesięcy) kontaktu ze środowiskiem tkankowym [4]. Odporność korozyjną i biotolerancję tkankową materiałów metalicznych można poprawić poprzez pokrywanie ich różnymi warstwami. Jednym z takich sposobów jest nanoszenie cienkich warstw tlenków metodą zol-żel [3,5-7].

W pracy przedstawiono wyniki badań, których celem było określenie wpływu chropowatości podłoża na topografię warstw  $TiO_2$  i  $SiO_2$  wytwarzanych metodą zol-żel oraz odporności nałożonych warstw na cyklicznie powtarzające się odkształcenia. W badaniach porównywano podłoża ze stali 316L i  $Ti_6Al_4V$ .

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na podłożach ze stali 316L oraz stopu  $Ti_6Al_4V$ . W obu przypadkach podłoża przygotowano z czterema różnymi chropowatościami powierzchni o wartościach nominalnych:  $Ra\ 0,16$ ,  $Ra\ 0,63$ ,  $Ra\ 1,25$  i  $Ra\ 2,5$ . Podłoża wykonano w postaci płaskich próbek prostokątnych o wymiarach  $50 \times 10 \times 1$  [mm]. Na tak przygotowane podłoża naniesiono metodą zol-żel trójpowłokowe warstwy  $TiO_2$  i  $SiO_2$ . Każdą z powłok uzyskano techniką zanurzenia podłoża w hydrolizacie i wynurzania z kontrolowaną prędkością. Po wyjęciu z hydrolizatu próbki suszono w temp.  $21-23^\circ C$  w atmosferze powietrza a następnie wygrzewano przez 2 godz. w temperaturze  $500^\circ C$ .

Badania chropowatości powierzchni przeprowadzono zgodnie z PN-EN ISO 4287 na profilometrze Talyrond 395 firmy Taylor Hobson. W pierwszym etapie wyznaczono chropowatość powierzchni dla próbek czystych podkładów. Drugi pomiar chropowatości przeprowadzono po nałożeniu na próbki odpowiednich warstw.

Kolejnym etapem badań było określenie odporności na cyklicznie powtarzające się odkształcenia warstw  $TiO_2$  i  $SiO_2$

# INFLUENCE OF SUBSTRATE ROUGHNESS ON $TiO_2$ AND $SiO_2$ COATING TOPOGRAPHY COATED BY FUNCTIONAL SOL-GEL DERIVED LAYERS

R. BĘDZIŃSKI<sup>1</sup>, J. FILIPIAK<sup>1</sup>, C. PEZOWICZ<sup>1</sup>, J. KRZAK-ROŚ<sup>2</sup>,  
M. KOWALSKI<sup>3</sup>

WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

<sup>1</sup> INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION,

<sup>2</sup> INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND APPLIED MECHANICS,

<sup>3</sup> INSTITUTE OF PRODUCTION ENGINEERING AND AUTOMATION

[*Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 87-89*]

## Introduction

In the modern medicine, especially in orthopaedic field, different kind of implants system are commonly used in the treatment of pathological changes and injuries of bone and joint. Regardless of many years of experience and the knowledge of surgeon teams, the insertion of implants to the human body initiates numerous problems of clinical and biomechanical nature. Complications include component loosening, deleterious biological responses, osteolysis, mechanical instability, decreased joint mobility, increased pain, and, ultimately, implant failure. Therefore, revision surgery is frequently necessary, particularly in younger, more active patients.

Various kinds of special constructional materials are used to production of implants. The main and numerous groups of these materials are presented by metallic materials among other things: austenitic steels, Co-Cr alloys, Ni-Cr alloys and titanium alloys. Because of very specific environment of human body materials for implants have to be characterized by: biotolerance, resistance to impact on tissue environment and biomechanical matching. Titanium and stainless steel alloys are commonly used for medical implants, mainly due to their good mechanical properties [4]. However, only titanium alloys are come up to presented properties. Other metallic materials are insufficient biocompatibility and corrosion resistance and scientists still are looking for good functional coatings, improving properties of on metal alloys [3,5-7].

The aim of this work were analysis of influence of substrate roughness on  $TiO_2$  and  $SiO_2$  coating topography coated by functional sol-gel derived layers and resistance of these layers on cyclic elastic strain. The 316L and  $Ti_6Al_4V$  substrates were compared.

## Material and methods

The stainless steel (316L) and titanium alloy ( $Ti_6Al_4V$ ) substrates were used for the research. The four different roughness with nominal values:  $Ra=0,16$ ,  $Ra=0,63$ ,  $Ra=1,25$  and  $Ra=2,5$  were prepared for both substrates. The substrates were made as rectangular samples of  $50 \times 10 \times 1$  [mm] (length-width-thickness). The coatings of titanium and silicon dioxides have been obtained and deposited using the dip-coating method. The titanium alloy ( $Ti_6Al_4V$ ) and iron alloy (316L) have been used as the substrates. The coatings were annealed by heating from room temperature up to  $500^\circ C$  and maintaining this temperature for 2h.

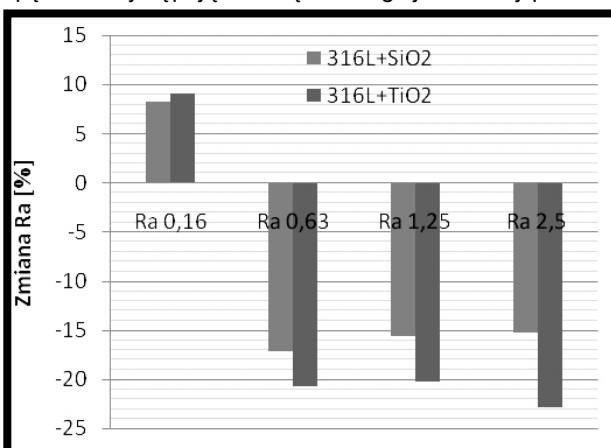
Surface roughness was measured according to PN-EN ISO 4287 by profilometry using a Talyrond 395 (Taylor Hob-

nałożonych na podłożach wykonanych ze stali 316L oraz stopu Ti6Al4V. W tym celu przygotowane próbki poddano próbie czteropunktowego zginania. Podczas testu ugięcie  $u$  próbki zmieniało się w zakresie od 1 do 3mm. Oznacza to, że dla przyjętego rozstawu podpór oraz geometrii próbki w środkowej części próbki odkształcenia zmieniały się w zakresie od 0,1% do 0,18%. Częstotliwość zmiany ugięcia wynosiła  $f=1\text{Hz}$ , a liczba wykonanych cykli  $n=40.000$ . Zastosowanie próby zginania pozwoliło na jednoczesne testowanie odporności warstw na działanie odkształceń o charakterze rozciągającym (dolna powierzchnia badanej próbki) i ściskającym (górna powierzchnia próbki). Ocenę odporności na cyklicznie powtarzające się odkształcenia warstw  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  przeprowadzono na drodze porównania obrazów mikroskopowych (SEM) badanych obiektów przed próbą cyklicznego zginania i po przeprowadzeniu próby.

## Wyniki

Badania mikroskopowe wykazują, że warstwy  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  naniesionych metodą zol-żel są ciągłe i odwierciedlają charakter struktury powierzchni. Porównanie chropowatości powierzchni czystych podłoży i warstw można stwierdzić, że wytworzone na powierzchni warstwy zmieniają wartość chropowatości. W przypadku podłoża o najniższej chropowatości spośród badanych, tj. Ra 0,16, po nałożeniu warstwy zaobserwowano wzrost chropowatości o 8,2% w przypadku warstwy  $\text{SiO}_2$  i o ponad 9% w przypadku warstwy  $\text{TiO}_2$ . Podobne wyniki dla niskich wartości chropowatości podłoża prezentowano w pracy [2]. Zupełnie inną tendencję obserwuje się gdy podłoża mają wyższą chropowatość. W naszych badaniach dla Ra 0,63, Ra 1,25 i Ra 2,5 zarejestrowano obniżenie chropowatości powierzchni z nałożoną warstwą, o kilkanaście procent w przypadku warstwy  $\text{SiO}_2$  i ponad 20% dla warstwy  $\text{TiO}_2$  (RYS. 1). Podobne relacje zarejestrowano zarówno dla podłoża ze stali 316L, jak i stopu Ti6Al4V.

Obserwacje mikroskopowe (SEM) pokazują, że na podłożach o niskiej chropowatości (Ra 0,16, Ra 0,63) powierzchnia naniesionej warstwy jest ciągła z siatką drobnych wydłużonych zagłębień. W przypadku podłoża o wyższej chropowatości (Ra 1,25 i Ra 2,5) pojawiają się charakterystyczne spękania powierzchni warstwy. Z analizy SEM wynika, że spękania występują w obrębie drugiej i trzeciej powłoki.



RYS. 1. Zmiany chropowatości powierzchni pokrytej warstwami  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  w zależności od chropowatości podłoża (przykład podłoża ze stali 316L).

FIG. 1. Roughness changes of surface with  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coatings depending on substrate roughness (example of 316L substrate).

son) profilometer. In the first stage of roughness analysis were measured clean substrates (without coatings), in second stage – substrates with coatings.

The influence of cyclical elastic strain on the resistant of  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  layers coated on stainless steel (316L) and titanium alloy (Ti6Al4V) substrates were examined in four point bending test. During examination the deflection of samples  $u$  were changed in range 1+3mm, which makes the true strain in the surface layer of the plate between the stamps equal to 0,1% ÷ 0,18%. Forty thousand cycles were applied in test. The strain amplitude of the cycle was  $f=1\text{Hz}$ .

During bending test analysis of tensile phenomenon of coating (bottom surface of samples) and compression phenomenon (upper surface of samples) was available. The morphology and texture of surfaces before and after cyclic loading was determined by SEM.

## Results

The microscopic analysis indicated the  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coating are continuous and reflected the structural properties of substrates surface. The roughness surface of clean substrates is changes after coated by  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coating. For lower roughness from among analysed it is Ra 0,16 after covered by coatings were observed increased of roughness by 8,2% in case of  $\text{SiO}_2$  coating and above 9% for  $\text{TiO}_2$  coating. The similar changes for lower roughness value was observed in paper [2]. In our research the different trend was noticed for upper value of substrate roughness. Decrease of roughness value for Ra 0,63, Ra 1,25 and Ra 2,5 in about several percent for  $\text{SiO}_2$  layer and above 20% for  $\text{TiO}_2$  layer were observed (FIG. 1). Similar relations were recorded for both type of substrates.

The microscopic (SEM) analysis showed that on the substrates surface with low roughness (Ra 0,16, Ra 0,63) the coating layer is continues with network of fine elongated hollows. The substrates with higher roughness (Ra 1,25 and Ra 2,5) have characteristic cracks and fractures on the coating layer. These cracks were observed (SEM analysis) within second and third coating layer. The first layer directly covered the substrate surface is continues. The network of cracks and fractures is resulted of shrinkage stress during the draying process of zol.

Ranges of gaps wide in  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coating depending on nominal roughness Ra of substrate were summarized in TABLE 1. It is imported to pointed that this kind of gaps can be very advantageous for tissue biointegrations of implants. For instance osteoblasts "not notice" the gaps if these are smaller then 0,6  $\mu\text{m}$  [1]. It is mean the surface with numerous of width gaps below of 0,6  $\mu\text{m}$  are very "friendly" for osteoblast. These cells were proliferation and synthetization of proteins to determine the beginning of new bone tissue.

TABELA 1. Przedziały szerokości szczelin w warstwach  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  w zależności od chropowatości nominalnej Ra podłoża (wartości podano w  $\mu\text{m}$ ).

TABLE 1. Ranges of gaps wide in  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coating depending on nominal roughness Ra of substrate (value in  $\mu\text{m}$ ).

	Ra 0,16	Ra 0,63	Ra 1,25	Ra 2,5
Ti6Al4V+TiO <sub>2</sub>	0,18÷0,45	0,21÷0,45	0,52÷1,26	0,56÷1,72
Ti6Al4V+SiO <sub>2</sub>	0,62÷1,05	1,15÷1,41	1,45÷3,00	1,68÷3,20
316L+TiO <sub>2</sub>	0,11÷0,35	0,28÷0,58	0,64÷1,55	0,74÷1,90
316L+SiO <sub>2</sub>	0,45÷0,85	1,12÷1,83	1,40÷3,45	2,11÷3,66

Pierwsza powłoka, ta bezpośrednio stykająca się z podłożem jest ciągła. Obserwowane spękania są wynikiem naprężeń skurczowych pojawiających się w wysychającej warstwie hydrolizatu powlekającej nierówności powierzchni podłoża. W TABELI 1 przedstawiono przedziały szerokości szczelin w warstwach w zależności od chropowatości podłoża. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że obecność takich szczelin na powierzchni implantów może mieć korzystne znaczenie z punktu widzenia biointegracji implantu i tkanki. Przykładowo osteoblasty (komórki kościotwórcze) „nie zauważają” szczelin o rozmiarach mniejszych

od  $0,6\mu\text{m}$  [1]. Oznacza to, że na powierzchni zaopatrzonej w liczne szczeliny o szerokości powyżej  $0,6\mu\text{m}$  osteoblasty będą chętnie osiedlały się, proliferowały i syntezowały białka stanowiące zaczątek tkanki kostnej. Z przeprowadzonych pomiarów wynika, że dla warstwy  $\text{TiO}_2$  korzystną topografię powierzchni dla rozwoju osteoblastów można zapewnić stosując podłoża o chropowatości Ra 1,25 i Ra 2,5, natomiast w przypadku warstwy  $\text{SiO}_2$  w pełnym analizowanym zakresie chropowatości od Ra 0,16 do Ra 2,5 takie warunki są zapewnione.

Podłoża ze stali 316L i stopu Ti6Al4V z naniesionymi warstwami  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  poddano testom, sprawdzającym ich odporność na cyklicznie powtarzające się odkształcenia. Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że 40.000 cykli zmian odkształcenia w zakresie od 0,1% do 0,18% nie spowodowały uszkodzeń naniesionych warstw.

## Podsumowanie

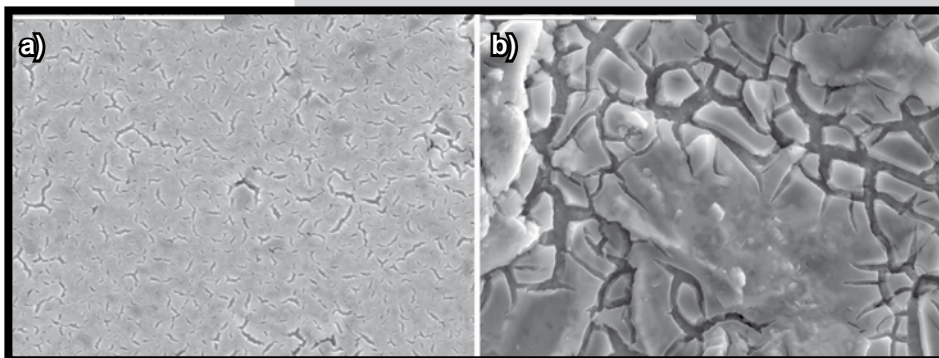
Przeprowadzone badania pokazują, że dobierając chropowatość podłoża pod warstwę  $\text{TiO}_2$  i  $\text{SiO}_2$  nanoszoną techniką zol-żel możliwe jest różnicowanie topografii powierzchni implantu, jednocześnie uzyskując efekt zwiększenia odporności na destrukcyjne oddziaływanie środowiska tkankowego. W zależności od założonego celu leczenia można uzyskać powierzchnię zapewniającą dobrą biointegrację implantu z tkanką kostną lub wtedy, gdy nie ma takiej potrzeby, powierzchnię umożliwiającą łatwe usunięcie implantu (implanty krótkoterminowe).

## Podziękowania

Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N507 009 31/0275).

## Piśmiennictwo

- [1] K. Anselme, P. Linez, M. Bigerelle, D. Le Maguer, A. Le Maguer, P. Hardouin, H.F. Hildebrand, A. Iost, J.M. Leroy: The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior, *Biomaterials* 21 (2000) 1567-1577.
- [2] D.D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D.Sotiropoulou, J. Amedee, Y.F. Missirlis: Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti6Al4V on human bone marrowcell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22 (2001) 1241-1251.
- [3] Głuszek J.: Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel. Wrocław 1998.
- [4] H. Kienapfel, C. Sprey, A. Wilke, R Griss: Implant Fixation by Bone Ingrowth, *The Journal of Arthroplasty* Vol. 14 No. 3 1999.



**RYS. 2. Obrazy mikroskopowe warstwy  $\text{TiO}_2$  nałożonej na stali 316L dla dwóch skrajnych chropowatości podłoża: a) Ra 0,16, b) Ra 2,5 (SEM, 3000x).**  
**FIG. 2. Images of stainless steel with  $\text{TiO}_2$  coating for two extreme different substrate surface roughness: a) Ra 0,16; b) Ra 2,5 (SEM, 3000x).**

The conducted research show that advantageous topography for osteoblasts is substrates surface with roughness value equal Ra 1,25 i Ra 2,5 for  $\text{TiO}_2$  coating layer and roughness from Ra 0,16 to Ra 2,5 for  $\text{SiO}_2$  coating layer.

The resistance of  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coating layers on cyclic elastic strain were analysed. The research show that forty thousand elastic strain cycles from 0,1% to 0,18% applied in test did not cause the damage of coatings.

## Summary

The presented analysis indicated that using selected roughness of substrates which are covered sol-gel techniques by  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  coatings is available receive diverse topography of implant surface and improve them properties. It is possible to obtain different aim of treatment depended on term of using implants for short or long-term period.

## Acknowledgements

*This work was financially supported by Polish Ministry of Science and High Education (N507 009 31/0275).*

## References

- [5] J. Krzak-Roś, D. Grygier, A. Baszczuk, R. Będziński: Mechanical and physico-chemical properties of titanium dioxide thin films, *Engineering of Biomaterials* Vol. X, No. 67-68, 2007, pp. 35-37.
- [6] A.Ochsenbein, F. Chai, S. Winter, M.Traisnel, J. Brems, H.F.Hildebrand: Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates, *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1506-1517.
- [7] D. Grygier, W. Dudziński, T. Wiktorczyk, K. Haimann: Effect of silica precursors-type on mechanical properties of sol-gel coatings. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, Vol. 10, No. 1, 2008, pp. 27-35.



# WSTĘPNE BADANIA NAD WYTWORZENIEM GĄBEK MAGNEZOWYCH INFILTROWANYCH POLIMEREM RESORBOWALNYM

B. SZARANIEC<sup>1</sup>, M. ZIĄBKA<sup>1</sup>, K. ZYGMUNT<sup>1</sup>, R. KUCHARSKI<sup>2</sup>,  
J. CHŁOPEK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW, POLSKA  
<sup>2</sup> LEIBNIZ-UST OF HANNOVER, DEPARTMENT OF MATERIAL  
SCIENCE, D-30823 GRABS EN, GERMANY  
\* E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

## Streszczenie

W pracy przeprowadzono ocenę zachowania się w środowisku biologicznym resorbowalnych kompozytów polimerowo-metalicznych. Stanowiące fazę metaliczną gąbki magnezowe impregnowano kopolimerem PLDLA metodą zanurzenia w roztworze. Na podstawie testów *in vitro* określono stopień degradacji kompozytów (pH, przewodnictwo). Przeprowadzono analizę mikrostruktury (SEM,  $\mu$ CT) oraz oszacowano porowatość całkowitą próbek.

Stwierdzono, że zastosowany polimer może spełnić funkcję bariery opóźniającej resorpcję implantu magnezowego. Proces ten wymaga jednak dalszych badań i optymalizację warunków imersji ponieważ polimer nie zabezpieczył w dostatecznym stopniu powierzchni magnezu przed zbyt szybko postępującą korozją.

**Słowa kluczowe:** kompozyty, materiały resorbowalne, magnez

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 90-93]

## Wprowadzenie

Materiały na bazie magnezu mogą stanowić jedną z propozycji implantów resorbowalnych o dobrych parametrach mechanicznych. Magnez występuje w organizmie ludzkim, a jego jony mają istotne znaczenie biologiczne m.in. utrzymują ciśnienie osmotyczne krwi, uczestniczą w przekazywaniu sygnałów w układzie nerwowym, a ich wysoka koncentracja sprzyja aktywacji komórek kostnych. Jak wynika z badań *in vivo* implanty magnezowe nie wykazują toksyczności, a produkty ich korozji są fagocytowane, bądź rozpuszczane i wydalane z organizmu [1].

Prowadzone są prace nad wytwarzaniem różnego typu implantów na bazie magnezu takich jak stenty, śruby czy rusztowania [2-6]. Ze względu jednak na fakt, że magnez i jego stopy zbyt szybko ulegają degradacji w środowisku wodnym istnieje, potrzeba wydłużenia czasu jego degradacji. Można to osiągnąć poprzez opracowanie nowych bardziej złożonych stopów lub poprzez zabezpieczenie magnezu przed bezpośrednim wpływem środowiska np. stosując odpowiednie pokrycia. Niniejsza praca stanowi próbę otrzymania kompozytów magnezowo-polimerowych mogących znaleźć zastosowanie jako materiał implantacyjny.

# PRELIMINARY STUDY OF THE MAGNESIUM SPONGES INFILTRATED WITH RESORBABLE POLYMER

B. SZARANIEC<sup>1</sup>, M. ZIĄBKA<sup>1</sup>, K. ZYGMUNT<sup>1</sup>, R. KUCHARSKI<sup>2</sup>,  
J. CHŁOPEK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> AGH-UST, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,  
30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>2</sup> LEIBNIZ-UST OF HANNOVER, DEPARTMENT OF MATERIAL  
SCIENCE, D-30823 GRABS EN, GERMANY

\* E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

## Abstract

The work concerns the assessment of resorbable polymer-metallic composite behaviour in the biological solution. Magnesium sponges were immersed with copolymer (PLDLA). On the basis of *in vitro* tests the degradation rate of composites was determined (pH and conductivity). Microstructure analyses (SEM,  $\mu$ CT) and total porosity for all samples were estimated. It was found that the polymer used can perform a function of inhibition barrier for implant's resorption. This process still requires another research and optimization of immersion's conditions due to the magnesium surface insufficient polymer protection against the rapid corrosion process.

**Keywords:** composites, resorbable materials, magnesium

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 90-93]

## Introduction

Magnesium based materials can play an essential role as resorbable implants due to their mechanical parameters. Magnesium, when present in the body, releases ions. They maintain blood osmotic pressure, taking part in signal transfer in the neurological system and their high concentration activate bone cells to grow. *In vivo* tests of magnesium implants revealed non-toxic behaviour. Products of magnesium corrosion are removed by phagocytosis process [1].

Recent works concern different types of magnesium implants such as stents, screws or scaffolds [2-6]. Due to fast magnesium degradation in the biological solution it is necessary to prolong its degradation time. That is achievable by elaboration of magnesium alloys or protection from solution influence by the magnesium surface covering. The current work is magnesium composites infiltrated with the polymer manufacturing attempt. Such types of materials can be used as implants.

## Materials and methods

Magnesium composites were manufactured by casting method. In the first stage of the experiment cylindrically shaped magnesium sponges (diameter=8mm, high=10mm) were obtained. For that purpose a porogen (NaCl) with grain-size above 500  $\mu$ m was taken. Pure magnesium was used as a precursor of sponges structure. In the manufacturing procedure salt was infiltrated with melt magnesium. This process was carried out under protective atmosphere. That is how magnesium casts were obtained (FIG. 1).



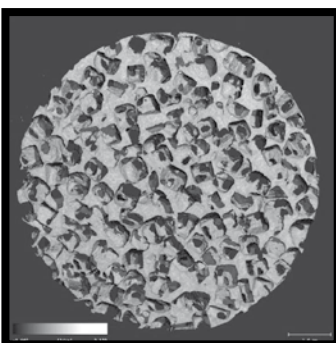
**RYS. 1. Cylindryczne odlewy magnezowe przed procesem usuwania porogenu.**  
**FIG. 1. Cylindrical magnesium casts before porogen removal.**

## Materiały i metody

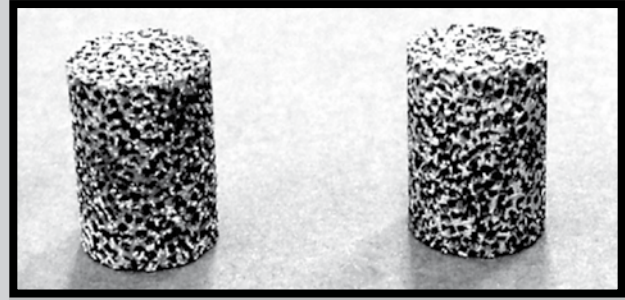
Kompozyty magnezowo-polimerowe wytworzono w procesie odlewania. W pierwszym etapie wytwarzania otrzymywano cylindryczne gąbki magnezowe o średnicy 8mm i wysokości 10mm. W tym celu jako środek porotwórczy zastosowano sól kuchenną NaCl o wielkości ziaren powyżej 500 $\mu$ m. Jako prekursor struktury gąbczastej użyto czystego magnezu. Następnie w atmosferze ochronnej przeprowadzono proces infiltracji soli magnezem, w efekcie którego otrzymano odlewy magnezowe (RYS. 1). W kolejnym etapie odlewy poddano obróbce skrawaniem. Usunięcie porogenu z materiału uzyskano w wyniku płukania próbek kolejno w roztworze NaOH oraz w wodzie destylowanej (RYS. 2). Po wysuszeniu sprężonym powietrzem próbki poddano trawieniu metodą grawitacyjną. Jako kąpiel trawiącą zastosowano mieszaninę kwasu octowego, azotanu(V)sodu oraz zjonizowanej wody. Kolejnym etapem była modyfikacja porowatego magnezu polimerem resorbowalnym PLDLA (kopolimer L-laktydu 92% i DL laktydu 8%; Centrum Polimerów i Materiałów Węglowych PAN, Zabrze).

Do nanoszenia polimeru resorbowalnego na próbki magnezowe wykorzystano urządzenie Dip Coater (model KSV-DC firmy LOT-Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt). Próbki magnezowe zanurzano w roztworze polimeru nanosząc odpowiednio jedną, dwie lub trzy warstwy i otrzymując w ten sposób różnego typu kompozycje (TAB. 1). Dodatkowo w czasie procesu pokrywania próbek polimerem sterowano takimi parametrami jak prędkość zanurzania oraz czas przebywania próbek w roztworze.

Mikrostrukturę otrzymanych gąbek magnezowych obserwowano przy pomocy mikrotomografu komputerowego (Scanco Medical 80) oraz elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM, JEOL 1560). Określono ich porowatość całkowitą. Na podstawie testów *in vitro* w wodzie i w płynie Ringera (4 tygodnie/37°C) oceniano degradację kompozytów magnezowych.



**RYS. 3. Fotografia  $\mu$ CT przedstawiająca rzut z góry porowatego magnezu po usunięciu porogenu.**  
**FIG. 3.  $\mu$ CT photography presented "up view" of porous magnesium after porogene removal.**



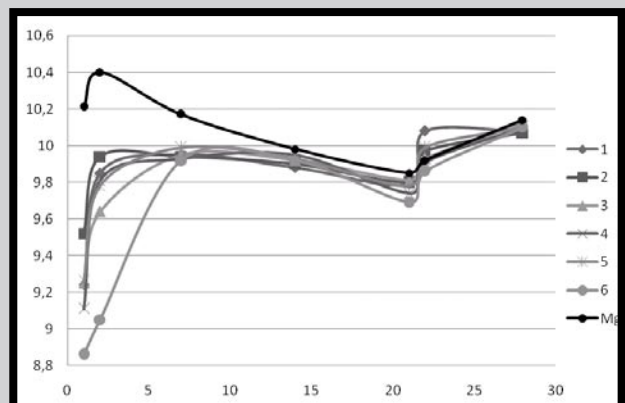
**RYS. 2. Cylindryczne odlewy magnezowe po usunięciu porogenu.**  
**FIG. 2. Cylindrical magnesium casts after porogen removal.**

Next, casts were machined. Porogen was removed from the material by the sample's rinsing with NaOH solution and after in the distilled water (FIG. 2). After drying with compressed air samples were gravitationally etched. For an etching batch a mixture of acetic acid, sodium nitrate and deionized water was used. Next stage of the experiment was a modification of pure magnesium with a resorbable polymer PLDLA (copolymer L-lactide 92% and DL lactide 8%; Polymers Centre and Carbon Materials-PAN, Zabrze).

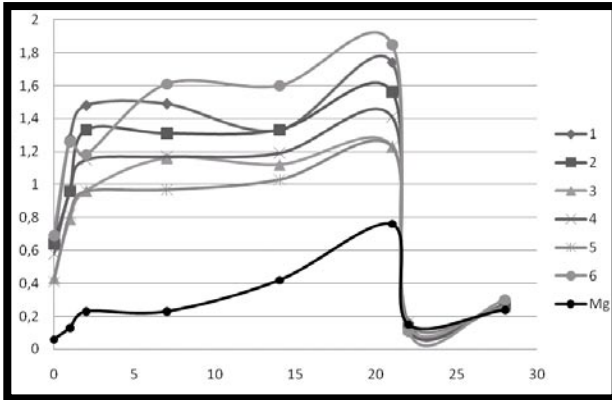
Magnesium samples were immersed with the polymer in the Dip Coater (model KSV-DC, LOT-Oriel GmbH & Co. KG, Darmstadt). Different compositions of layers (single, double, triple layer) were obtained (TAB. 1). Additionally, during the immersing process parameters such as an immersion velocity and the time of immersion were controlled.

**TABELA 1. Rodzaje gąbek polimerowo-metalicznych.**  
**TABLE 1. Different types of polymer-metallic sponges.**

Numer próbki Sample's number	Polimer Polymer	Ilość cykli Number of cycles	Prędkość zanurzenia Immersion velocity [mm/min]	Czas immersji Immersion time [s]
1	PLDLA	1	5	90
2	PLDLA	1	85	30
3	PLDLA	2	85	30
4	PLDLA	2	5	90
5	PLDLA	3	85	30
6	PLDLA	3	5	90



**RYS. 4. Zmiany pH płynu Ringera podczas inkubacji gąbek Mg/PLDLA.**  
**FIG. 4. pH changes of Ringer solution during the Mg/PLDLA sponge's incubation.**



**RYS. 5.** Zmiany przewodności wody destylowanej podczas inkubacji gąbek Mg/PLDLA.  
**FIG. 5.** Conductivity changes of distilled water during the Mg/PLDLA sponge's incubation.

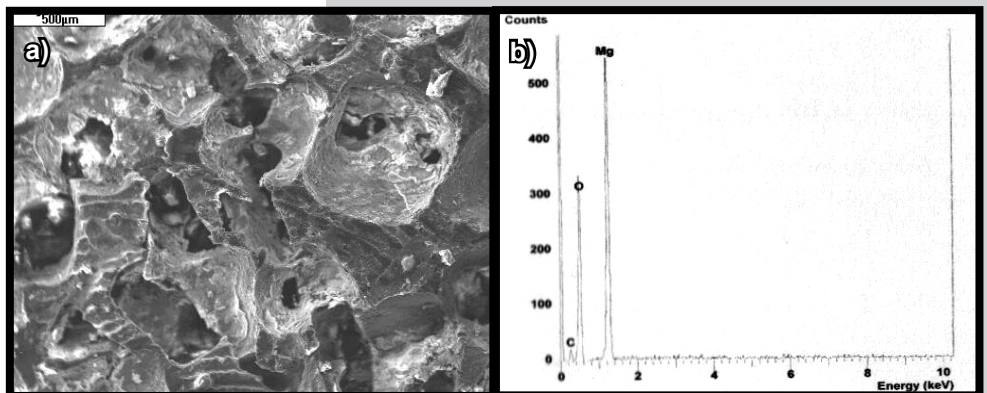
## Wyniki i dyskusja

Badania przy pomocy mikrotomografii komputerowej wykazały, że otrzymane próbki magnezowe posiadają mikrostrukturę porowatą, odpowiadającą wielkość ziaren soli. Pory otwarte o rozmiarach powyżej 500 $\mu\text{m}$  rozmieszczone są równomiernie w całej objętości (RYS. 3). Porowatość całkowita otrzymanych walców magnezowych wynosi ok. 70%, co w przybliżeniu odpowiada porowatości kości gąbczastej.

Jak wynika z testów *in vitro* zastosowanie PLDLA jako pokrycia ochronnego na gąbczastych strukturach magnezowych ma korzystny wpływ na ich zachowanie w środowisku płynów biologicznych (RYS. 4, RYS. 5). Polimer resorbowalny poprzez częściowe zablokowanie dostępu płynów chroni komórkową strukturę magnezową przed zbyt szybką resorpcją i zbyt intensywnym wydzielaniem się produktów rozkładu do otoczenia. Efekt ten jest widoczny zwłaszcza w pierwszych dniach inkubacji (poniżej 2 tygodni). Szybkość resorpcji kompozytu zależy również od prędkości zanurzenia oraz liczby cykli. Im mniejsza prędkość zanurzenia i większa liczba cykli tym lepsze zabezpieczenie przed korozją, o czym świadczy wolniejszy wzrost pH.

Badania wykazały, że pokrycie polimerowe może opóźniać resorpcję magnezu jednakże powierzchnia metalu nie jest dostatecznie zabezpieczona przed korozją, o czym świadczy podwyższone pH środowiska. W konsekwencji kompozyty tego typu wymagają dalszego udoskonalenia, gdyż tak znaczna alkalizacja środowiska może być niebezpieczna dla organizmu.

Obserwacje mikrostrukturalne wykazały wpływ środowiska wodnego (woda/Ringer) na zachowanie się kompozytów (Rys. 6a). Porównując powierzchnię wyjściowych kompozytów oraz kompozytów po czterotygodniowej inkubacji w wodzie, dla próbek narażonych na działanie środowiska wodnego zaobserwowano korozję. Zjawisko to potwierdzają widma EDS (Rys. 6b), które w przypadku próbek po inkubacji wskazują na większą zawartość tlenu.



**RYS. 6. a)** zdjęcie SEM gąbki Mg/PLDLA po 4 tygodniach inkubacji w wodzie destylowanej; **b)** analiza EDS gąbki Mg/PLDLA po 4 tygodniach inkubacji w wodzie destylowanej.

**FIG. 6. a)** SEM photograph of Mg/PLDLA sponge after 4 weeks of incubation in distilled water; **b)** EDS analyses of Mg/PLDLA sponge after 4 weeks of incubation in distilled water.

Computer microtomography (Scanco Medical 80) and scanning electron microscopy (SEM, JEOL 1560) was used to observe microstructure of magnesium sponges. Also, a total porosity was estimated. On the basis of *in vitro* tests which were carried out in water and Ringer solutions (4 weeks/37°C) the degradation of magnesium composites was determined.

## Results and discussion

Results of computer microtomography showed that magnesium samples had porosity similar to the shape and the grain-size of salt (porogen). Open pores with pore size above 500 $\mu\text{m}$  were distributed uniformly in whole volume (FIG. 3). Total porosity of the magnesium samples was averaged for about 70%, which is similar to the porosity of spongy bone.

*In vitro* tests showed that the introduction of PLDLA on the magnesium spongy structures as a protective covering had favourable influence on its behaviour in biological solution (FIG. 4, FIG. 5). Resorbable polymer protected magnesium cellular structure from rapid resorption and too intense degradation products realising. This type of effect was mostly visible in the first days of incubation (under 2 weeks). The velocity of the composite resorption depended on an immersion velocity and number of cycles. The lower velocity of immersion and the higher number of cycles the better protection against corrosion was possible to obtain. Such behaviour was proved by slower pH increase.

Examinations showed that the polymer covering can delay magnesium resorption but the metal surface was not protected enough against rapid corrosion progress which was proved by the pH rising. In the consequence, such composites should be improved in order to significant solution alkalization which could be dangerous for organism

Microstructural observations showed solution's (water/Ringer) influence on the composites behaviours (Fig. 6a). Initial composites in comparison to the composites after four week's incubation in water revealed corrosion. This effect was proved by EDS spectra (FIG. 6b) which, for the samples after incubation, showed higher oxygen contents.

## Wnioski

1) Otrzymano gąbki magnezowe o porowatości całkowitej ok. 70% i rozmiarze porów powyżej 500µm.

2) Impregnacja gąbek magnezowych polimerem PL(DL)LA początkowo ograniczyła resorpcję metalu przy czym stopień zabezpieczenia materiału był zależny od liczby cykli oraz prędkości zanurzenia w roztworze polimeru.

3) Zastosowany rodzaj polimeru oraz parametry procesu immersji nie zabezpieczają w dostatecznym stopniu powierzchni metalu przed korozją. Po czterech tygodniach inkubacji obserwuje się degradację kompozytów.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu nr 11.11.160.367.

## Conclusions

1) Magnesium sponges with total porosity averaged about 70% and size pores above 500µm were obtained.

2) Magnesium sponges immersed with the polymer such as PLDLA limited originally metal resorption. The level of material protection depended on immersion velocity and number of cycles.

3) Polymer used and parameters of the immersion did not protect a metal surface against the corrosion sufficiently. After four weeks of incubation the composite's degradation was observed.

## Acknowledgements

This work was financially supported by the project No. 11.11.160.367.

## Piśmiennictwo

[1] Mark P. Staiger, Alexis M. Pietak, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review, *Biomaterials* 2006, 27: 1728–1734.

[2] B Heublein, R Rohde, V Kaese, M Niemeyer, W Hartung, A Haverich: Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology. *Heart* 2003;89:651-656.

[3] B Denkena, F Witte, C Podolsky, A Lucas: Degradable implant of magnesium alloys. Proc. of 5th Euspen International Conference, Montpellier, France 2005.

## References

[4] Park JB, Kim YK. Metallic biomaterials. In: Park JB, Bronzino JD, editors. *Biomaterials principles and application*. Boca Raton: CRC Press; 2003.

[5] Huang J J, Yang K. Research on magnesium alloys for biomedical applications. *Materials Review*, 2006, 20(4): 67–69 (In Chinese).

[6] Huang J J, Ren Y B, Zhang B C, et al. Study on biocompatibility of magnesium and its alloys. *Rare Metal Materials and Engineering*, 2007, 36: 1002–1005.

## WŁÓKNA W MEDYCYNIE I W INŻYNIERII BIOMATERIAŁÓW – PRZEGLĄD ZASTOSOWAŃ

IZABELLA RAJZER\*, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS, JAROSŁAW JANICKI

ATH AKADEMIA TECHNICZNO-HUMANISTYCZNA,  
WYDZIAŁ NAUK O MATERIAŁACH I ŚRODOWISKU,  
INSTYTUT INŻYNIERII TEKSTYLÓW I MATERIAŁÓW POLIMEROWYCH,  
UL. WILLOWA 2, 43-309 BIELSKO-BIAŁA, POLSKA

\* E-MAIL: IPIEKARC@YAHOO.ES

### Streszczenie

Zastosowanie włókien oraz wyrobów włókienniczych w medycynie wzrosło intensywnie na przestrzeni ostatnich lat. Obecnie włókna i biotekstylija wykorzystywane są niemal we wszystkich dziedzinach związanych z medycyną i ochroną zdrowia. Materiały włókniste stosowane są zarówno jako tzw. „materiały do użytku zewnętrznego” czyli między innymi specjalistyczna odzież ochronna jak również w postaci artykułów higienicznych, materiałów opatrunkowych, w urządzeniach pozaustrojowych oraz jako materiały implantacyjne, stykające się bezpośrednio z tkankami pacjenta. W pracy przedstawiono przegląd zastosowań włókien i materiałów włóknistych w medycynie i inżynierii biomateriałów.

**Słowa kluczowe:** tekstyilia medyczne, biomateriały, implanty włókniste

[*Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 93-97*]

## FIBERS IN MEDICINE AND BIOMATERIALS ENGINEERING – REVIEW OF APPLICATIONS

IZABELLA RAJZER\*, JOANNA GRZYBOWSKA-PIETRAS, JAROSŁAW JANICKI

ATH UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA,  
FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES,  
INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE,  
2 WILLOWA STR., 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

\* E-MAIL: IPIEKARC@YAHOO.ES

### Abstract

The use of fibres and textiles in medicine has grown dramatically within the last years. Nowadays the application of fibres and biotextiles is widespread and covers all aspects of medicine and health care. Medical textiles are used widely as: “materials for external application”, such as protective healthcare garments, hygiene products, wound dressing materials, extracorporeal devices, and as implantable textile, which has a direct contact with patient tissues. In this work an introduction to fibre and textile will be presented along with a discussion of application areas.

**Keywords:** medical textiles, biomaterials, fibrous implants

[*Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 93-97*]

Dynamiczny rozwój nowych technologii w połączeniu z postępem i rosnącymi wymaganiami w dziedzinie medycyny sprawił, że tekstylia stanowią niezwykle obiecującą grupę materiałów dla zastosowań medycznych. Obecnie możliwa jest produkcja włókien nie tylko o różnorodnych właściwościach fizyko-chemicznych zapewniających komfort i bezpieczeństwo pacjenta czy personelu medycznego lecz również wytwarzane są włókna o specyficznych właściwościach biologicznych pozwalających na szybszą regenerację uszkodzonych tkanek czy organów.

W zależności od przeznaczenia materiały włókniste mogą być wytwarzane w formie: dzianin, włóknin, tkanin, plecionek, siatek bądź włókien stanowiących fazę wzmacniającą kompozyty [1-4].

Możliwość modyfikacji powierzchni włókien, jak również wprowadzania wypełniaczy w formie nanometrycznej (nanocząstek ceramicznych, nanoproszków metalicznych lub nanorurek), pozwala uzyskać materiały o polepszonych właściwościach wytrzymałościowych, termicznych oraz zwiększonej odporności na działanie czynników zewnętrznych. Modyfikacja włókien poprzez zastosowanie dodatków o większych rozmiarach niż nanometryczne, takich jak mikrosfery lub mikrokapsuły, wypełnionych związkami chemicznymi wykazującymi zdolność stopniowego ich uwalniania, pozwala na uzyskanie materiałów o polepszonych właściwościach biologicznych oraz o właściwościach antybakteryjnych czy antygrzybiczych.

## Materiały włókniste w medycynie

Materiały włókniste wykorzystywane w medycynie, ze względu na zastosowanie można podzielić na dwie grupy: I. Materiały włókniste nieimplantacyjne takie jak:

1. Materiały przeznaczone na specjalistyczną odzież ochronną oraz wyposażenie sal operacyjnych,
  2. Materiały włókniste kontaktujące się z skórą pacjenta, artykuły higieniczne
  3. Materiały włókniste wykorzystywane w urządzeniach i aparaturze medycznej
- II. Materiały włókniste przeznaczone na implanty
1. Nici chirurgiczne
  2. Implanty tkanki miękkiej
  3. Implanty tkanki twardej
  4. Podłoża tkankowe

### I. Materiały włókniste nieimplantacyjne

Pierwszą najbardziej popularną grupę tekstyliów stosowanych w medycynie stanowią włókniste materiały nieimplantacyjne.

Wśród tej grupy materiałów włóknistych znajdują się tekstylia przeznaczone na specjalistyczną odzież medyczną, bieliznę szpitalną o zwiększonej odporności na rozwój drobnoustrojów chorobotwórczych, elementy wyposażenia sal operacyjnych (odzież, chusty chirurgiczne) czy pokrycia materacy szpitalnych.

Przy produkcji anty-odleżynowych pokryć materaców szpitalnych czy też podkładów higienicznych stosowane są między innymi dzianiny na bazie poliestru/bawełny powlekane polichlorkiem winylu czy poliuretanem. Dla chorych leżących istotne jest utrzymanie skóry w jak najlepszym stanie. Dzięki zastosowaniu dzianin posiadających doskonałe właściwości takie jak wodoszczelność czy paroprzepuszczalność (materiały „oddechające”) możliwe jest zapewnienie pacjentom uczucia zwiększonego komfortu.

W warunkach klinicznych występuje konieczność noszenia przez personel medyczny antybakteryjnych ubrań

## Introduction

The dynamic development of new technology coupled with the progress and growing demands of medicine have all caused textile materials to have taken on the role of an especially promising group of materials for medical applications. Nowadays, it is possible to manufacture fibres with not only diverse physical and chemical properties that ensure the comfort and safety of the patient or the medical staff, but also fibres are produced with special biological properties enabling faster regeneration of damaged tissues or organs.

Depending on the purpose, fibrous materials can be produced in the following forms: knitted fabrics, non-woven fabrics, woven fabrics, plaited fabrics or fibres for the reinforcement of composites [1-4].

The potential for fibre surface modification, or for the inclusion of additives in nanometric forms (ceramics nanoparticles, metallic nanopowders or nanotubes) makes it possible to obtain materials with improved strength, thermal properties and increased resistance to the outdoor factors. Modification of fibres through the use of additives larger than the nanometric scale, such as microspheres or microcapsules filled with chemical compounds, with gradual release abilities, makes it possible to obtain materials with improved biological properties, as well as better antibacterial or antifungal properties.

## Fibrous materials in medicine

Fibre and its products, used in the medical field, according to their medical applications can be divided in two groups:

I. Non-implantable fibrous materials such as:

1. Fibrous materials for protective healthcare garments and operating theatre equipment
2. Fibrous materials which may have contact with skin, hygiene products
3. Fibrous materials used in extracorporeal devices

II. Implantable textiles

1. Sutures
2. Soft tissue implant
3. Hard tissue implants
4. Tissue scaffolds

### I. Non-implantable fibrous materials

The first, most common group of textiles used in medicine are non-implantable fibrous materials. That group of fibrous materials includes textiles designed for specialized medical wear, hospital linen with improved resistance to the development pathogenic micro-organisms, operating room equipment (clothing, surgical cloths) or hospital mattress covers.

The manufacturing process of antibedsores mattress covers or hygiene incontinence sheets includes using PVC- or polyurethane-covered polyester/cotton-based knitted materials. For lying patients, it is essential to maintain their skin in the best condition possible. Due to the use of knitted materials with superb properties such as water resistance or water vapour permeability (“breathable” materials), it is possible to provide patients with a sense of increased comfort.

In clinical conditions, there is a need for the medical staff to wear antibacterial clothes, facemasks and to use antibacterial hospital bed linen. Such applications usually require the use of unwoven fabrics (usually for single-use materials) and cloth (reusable materials).

Surgical masks are designed to protect the patient from staff-spread contagious factors and, in some situations, they protect the staff from the infiltration of potentially contagious

i masek oraz konieczność stosowania antybakteryjnej pościeli szpitalnej. Do takich zastosowań najczęściej używane są włókniny (zazwyczaj na materiały jednorazowego użytku) oraz tkaniny (materiały nadające się do wielokrotnego użycia).

Maska chirurgiczna służy do ochrony pacjenta przed rozprzestrzenianymi przez personel czynnikami zakaźnymi oraz w pewnych sytuacjach chroni personel przed przesiąkaniem potencjalnie zakaźnych płynów. Również fartuchy chirurgiczne i okrycia ochronne muszą stanowić barierę dla zakażenia. Oznacza to, że w czasie użytkowania nie mogą przepuszczać płynów i mikroorganizmów, tzn. muszą wytrzymać odpowiednie ciśnienie, które może być wywierane na fartuch podczas zabiegu [5]. Materiały, z których obecnie są wykonywane fartuchy i obłożenia, są różnorodne: tkaniny (naturalne i syntetyczne), włókniny, włókniny laminowane. Zazwyczaj na okrycia ochronne dla lekarzy i personelu medycznego stosowane są włókna celulozowe, z polietylenu, polipropylenu lub bawełniane. Często włókna te są modyfikowane poprzez wprowadzanie do płynów przedzalnicych środków antybakteryjnych lub poprzez wprowadzanie na etapie wytwarzania włókien do tworzywa włóknotwórczego, związków metali o charakterze antybakteryjnym. Powszechnie wiadomo, że większość zakażeń występuje podczas zabiegu operacyjnego, poprzez przedostanie się mikroorganizmów do otwartej rany, dlatego powłoki antybakteryjne stosowane są również na chustkach chirurgicznych w celu zmniejszenia ryzyka zanieczyszczenia rany [2].

Materiały włókniste zaliczane do tej grupy, powinny być łatwe w utrzymaniu czystości i dezynfekcji, muszą to być materiały niealergizujące, antyelektrostatyczne, antygrzybiczne oraz odporne na przenikanie płynów.

Biotekstylija odgrywa również ważną rolę w leczeniu ran. Drugi rodzaj materiałów nieimplantacyjnych stosowanych w medycynie stanowią materiały kontaktujące się ze skórą pacjenta [19]. Są to materiały opatrunkowe (bandaże, opaski uciskowe, gazy, plastry) oraz artykuły higieniczne (pieluchy jednorazowego użytku, chusteczki itp.). Zazwyczaj na bandaże elastyczne stosowane są włókna z poliuretanu (tzw. spandex). W Polsce stosuje się włókna z wysokoelelastycznej przędzy poliuretanowej i poliamidowej [6]. W produkcji środków higienicznych dla kobiet stosowane są włókna celulozowe. Natomiast opatrunki produkuje się z włókien z polimerów naturalnych np. takich jak bawełna, chitozan, często spotykane są opatrunki alginianowe - posiadające zdolność oczyszczania ran z drobnoustrojów (Kaltostat, Kaltogen, Sea Sorb, AlgisiteM, Sorbalgon, Sorbsan) poliuretanowe - mające zdolność pochłaniania dużej ilości wysięgu (Allewin, Allewin cavity, Lyofam, Tielle) oraz opatrunki posiadające zdolność pochłaniania zapachu (Actisorb, ActisorbPlus, Kaltocarb, LyofamC, Versiva, Carboflex, Carbonet, Combiderm, CutinovaHydro, Inadine, Nu-Gel, Fibracol, Promogran). Oprócz tych podstawowych grup opatrunków istnieją także opatrunki złożone o wieloskładnikowej budowie, dzięki temu ich działanie jest szersze niż preparatów jednoskładnikowych [7-8].

Śród materiałów włóknistych dla zastosowań medycznych coraz większym zastosowaniem cieszą się nanowłókna. Nanowłókna z biodegradowalnego polimeru mogą być natrykiwane na zranioną, poparzoną skórę. Obecność nanowłókien w opatunku sprzyja formowaniu się naturalnej skóry, zapobiegając powstawaniu blizny jak ma to miejsce w trakcie tradycyjnego leczenia [9].

Materiały opatrunkowe muszą posiadać określone cechy. Najważniejsze z nich to ochrona przed infekcją oraz zdolność absorpcji krwi. Jednocześnie powinny to być materiały delikatne i łatwe do zastosowania oraz usunięcia [2]. W przypadku środków opatrunkowych, podobnie jak w

liquids. Also surgical aprons and protective clothing must form a barrier against infection. This means that while they are in use, they may not let through liquids and micro-organisms, i.e. they have to resist the appropriate pressure which may be exerted on the apron during an operation [5].

Materials aprons and wrappings are currently made of are diverse: Fabrics (natural and synthetic), unwoven cloths, laminated unwoven cloths. Usually used for doctors' and medical personnel's protective clothing are cellulose fibres, made of polyethylene, polypropylene or cotton. These fibres are often modified through adding antibacterial agents to spinning liquids or adding antibacterial metal compounds to the fibroplastic material at the stage of fibre manufacture. It is a well-known fact that most infections occur during the operation, as a result of micro-organisms penetrating into an open wound, which is a reason why antibacterial coatings are also used for surgical cloths to minimize the risk of wound contamination [2]. Fibrous materials included in this group should be easy to keep clean and disinfect, they must be nonallergic, anti-electrostatic, antifungal and resistant to liquid penetration.

Biotextiles also play an important role in wound healing. The second kind of nonimplantable materials used in medicine are materials used for external application on the body with skin contact [19]. They include wound dressing products (bandages, tourniquets, gauze, plasters) and hygiene products (single-use diapers, tissues etc.) Usually used for elastic bandages are polyurethane fibres ("spandex"). In Poland, highly elastic polyurethane and polyamide yarn fibres are used [6]. In feminine hygiene product manufacture, cellulose fibres are used. Dressing products on the other hand are made from natural polymer fibres, such as cotton, chitosan; alginate dressing products are also popular – they have the capacity to cleanse wounds of microorganisms (Kaltostat, Kaltogen, Sea Sorb, AlgisiteM, Sorbalgon, Sorbsan), as well as polyurethane products – with the capacity to absorb great amounts of effusion (Allewin, Allewin cavity, Lyofam, Tielle) and odour-absorbing dressing products (Actisorb, ActisorbPlus, Kaltocarb, LyofamC, Versiva, Carboflex, Carbonet, Combiderm, CutinovaHydro, Inadine, Nu-Gel, Fibracol, Promogran). Apart from those basic dressing product groups, there are also multicomponent-structure compound dressing products, which makes their action more extensive than that of single-component preparations [7-8].

Among fibrous materials for medical purposes, nanofibres are being more and more widely applied. Nanofibres of biodegradable polymers can be directly sprayed onto the injured location of skin to form a fibrous mat dressing, which can let wounds heal by encouraging the formation of normal skin growth and eliminate the formation of scar tissue which would occur in a traditional treatment [9].

Dressing materials must have certain qualities. The most important ones include protection against infection and blood absorption. At the same time, the materials should be delicate and easily to apply or remove [2]. In case of dressing products, just as in case of materials used for the fitting of operating rooms and for specialized protective clothing, various modifications are used. Fibres and yarn are a perfect carrier of pharmacologic preparations and there is virtually hardly any medicament that could not be introduced into textiles [10]. Traditional sanitary fibres are often combined with active microcapsules made of dibutyrylochitin, containing active biological substances in the form of medicine.

Another no less important direction for the application of fibres in medicine is medical equipment and systems as well as different healing support agents [11]. Fibres used for bodily function support of organs such as lungs, kidneys, liver, heart as well as blood-cooperating equipment (drug delivery devices, blood access shunts, air or power lines for

przypadku materiałów stosowanych na wyposażenie sal operacyjnych i specjalistyczną odzież ochronną stosuje się różnego rodzaju modyfikacje. Włókna i przędze są doskonałym nośnikiem preparatów farmakologicznych i nie ma praktycznie medykamentu, którego nie dałoby się wprowadzić do wyrobów włókienniczych [10]. Często tradycyjne włókna sanitarne łączy się z aktywnymi mikrokapsułami wykonanymi z dibutyrylochityny, zawierającymi substancje biologicznie czynne w postaci leku.

Innym nie mniej ważnym kierunkiem zastosowania włókien w medycynie jest sprzęt i aparatura medyczna oraz różne środki wspomagające procesy leczenia [11]. Włókna stosowane są w urządzeniach służących do podtrzymywania funkcji życiowych organów takich jak płuca, nerki, wątroba, serce jak również w urządzeniach współpracujących z krwią (urządzenia do dawkowania leków przez skórę, cewki współpracujące z krwią, izolacje przewodów do rozruszników serca) [12]. Stosowane są tutaj między innymi włókna celulozowe, poliestrowe (sztuczne nerki), polipropylenowe (sztuczne płuca) polisulfonowe (dializa) [11].

## II. Materiały włókniste przeznaczone na implanty

Drugą grupę materiałów włóknistych stosowanych w medycynie stanowią implanty stykające się bezpośrednio z tkankami pacjenta. Są to materiały przeznaczone na szwy i nici chirurgiczne, implanty tkanki miękkiej oraz tkanki twardej, sztuczne żyły i tętnice [13].

Materiały szewne są najpowszechniej używanymi materiałami implantacyjnymi w chirurgii. Stosowane są one do zespalania wszystkich rodzajów tkanek w ciele człowieka. Istnieje wiele rodzajów nici chirurgicznych, posiadających różną grubość, wytrzymałość, gładkość powierzchni i w różny sposób zachowujących się w środowisku biologicznym [14]. Możemy je podzielić na resorbowalne (np.: PGA), degradowalne (np.: Iniane, poliamidowe) i biostabilne (np.: poliestrowe), jedno- i wielowłókienkowe, naturalne (np.: jedwab, kolagen-katgut) i sztuczne (np.: nylon, polipropylen).

Materiały włókniste kompatybilne z tkankami miękkimi wykorzystywane są przede wszystkim jako protezy naczyń krwionośnych, protezy więzadeł i ścięgien, protezy powięzi mięśni (np.: włókna poliestrowe), siatki chirurgiczne do operacyjnego leczenia przepuklin (np.: włókna polipropylenowe) oraz jako podłoża dla sztucznej skóry. Spośród włókien naturalnych dużym powodzeniem w leczeniu tkanek miękkich cieszą się: kolagen, jedwab, celuloza oraz włókna z modyfikowanych polisacharydów takie jak chityna (chitozan). Kolagen jest głównym składnikiem ludzkiego organizmu, więc implanty o powierzchni modyfikowanej tym materiałem łatwo adhezuje do tkanki miękkiej.

W leczeniu tkanek twardych materiały włókniste wykorzystywane są najczęściej w postaci kompozytowych płytek i śrub do zespalania odłamów kostnych oraz tzw. klatek do zespalania kręgow kręgosłupa. Protezy kości czaszki są wytwarzane z przędzy polipropylenowej i poliestrowej. Materiały te posiadają parametry fizyczne zbliżone do naturalnej kości [6]. Trwają również badania nad osadzaniem nanowłókien w postaci cienkich, porowatych filmów na protezach tkanek twardych. Gradientowa struktura włóknista filmu pracuje jako międzyfaza pomiędzy biomateriałem a tkanką gospodarza i ma za zadanie redukować przeszywnienie na granicy tkanka-biomateriał oraz zapobiegać uszkodzeniu biomateriału po jego implantacji [9].

Materiały włókniste znajdują coraz większe zastosowanie jako trójwymiarowe podłoża (tzw.: scaffoldy) w regeneracji ubytków tkanki chrzęstnej i kostnej. Przewagą podłoży włóknistych w stosunku do innych podłoży stosowanych w inżynierii tkankowej jest możliwość dokładnego zaprojektowania mikrostruktury, wyższy współczynnik rozwinięcia powierzchni, większa możliwość manipulacji mikrostruk-

heart) [12]. Applied here are, among others, cellulose fibres, polyester fibres (kidney machines), polypropylene fibres (lung machines) polysulfone fibres (dialysis) [11].

## II. Implantable fibrous materials

The second group of textile materials used in medicine are implants designed for direct contact with patient's tissues. They have been used as sutures or threads, soft and hard tissue implants or as vascular and arterial graft [13]. Surgical threads are the most common implants in surgery. Sutures materials are used to join all kinds of tissues in human body. There are a lot kinds of surgical threads differing in thickness, mechanical strength, surface quality and their behaviour in contact with the body [14].

Suture materials can be put into different groups as resorbable (PGA) or degradable (polyamide) and biostable (polyester), mono or multifilament, natural (silk, collagen) and synthetic (nylon, polypropylene).

Fibrous materials which are compatible with soft tissue, have been successfully used as vascular graft, prosthesis of tendons and ligaments, muscle prosthesis (polyester fibres), as support mesh for hernia repair (polypropylene) and as scaffold for artificial skin. Natural fibres created from collagen, silk, cellulose and modified polysaccharides including chitosan are of growing interest in soft tissue reconstruction. Collagen is a main component of human organisms, implants which have a surface modified with these material adhere easily to the soft tissue.

In the therapy of hard tissues, fibrous materials are most often used in the form of composite plates and screws for joining bone chips and the so-called vertebrae-joining cages. Skull-bone prostheses are manufactured from polypropylene and polyester yarn. Those materials' physical parameters are close to those of natural bone [6]. Research is also underway into depositing nanofibres as thin porous films onto hard tissue prosthetic devices. This coating film with gradient fibrous structure works as an interphase between the prosthetic device and the host tissue, and is expected to efficiently reduce the stiffness mismatch at the tissue/device interphase and hence prevent the device failure after the implantation [9].

Fibrous materials are finding more and more applications as three-dimensional scaffolds for the regeneration of cartilaginous and bone tissue wastage. The advantage of fibrous scaffolds over other scaffolds used in tissue engineering is the ability to precisely design the microstructure, their higher coefficient of surface development, greater ability to manipulate their scaffold structure (ability to control parameters such as fibre orientation or scaffold porosity) and its properties. It has been observed that the orientation of fibres in fibrous scaffolds has a positive effect on the orientation of collagen fibres. Polyglycolyde and polyactide fibrous scaffolds are widely used as scaffolds for the regeneration of tissue because of their high porosity and biodegradation rate. Out of natural polymers in application for tissue engineering, the following are applied in the form of fibrous scaffolds: chitosan, silk, alginates. It is also possible to manufacture scaffolds for the reconstruction of collagen fibrous structure wastage. Apart from healing cartilaginous and bone tissue wastage, fibrous scaffolds are an attractive material for the reconstruction of ligaments and tendons [15]. Nearly all human tissues and organs are deposited onto nanofibrous structures. Collagen is the main natural component of the extracellular matrix, it is found in the form of 50-500 nm diameter fibres. A polymer matrix made of nanofibres can be identical to extracellular matrix proteins both with respect to the chemical composition and the physical construction. Thus, nanofibres seem to be a perfect biomimetic candidate for tissue engineering scaffolds. Research is underway

turą scaffoldu (możliwość kontroli takich parametrów jak orientacja włókien czy porowatość podłoża) oraz jego właściwościami. Zaobserwowano, że orientacja włókien w scaffoldach włóknistych pozytywnie wpływa na orientację włókien kolagenowych. Podłoża włókniste z poliglikolidu i polilaktydu są szeroko stosowane jako scaffoldu do regeneracji tkanek ze względu na ich wysoką porowatość i szybkość biodegradacji. Spośród polimerów naturalnych w zastosowaniu dla inżynierii tkankowej w postaci włóknistych podłoży stosowane są: chitozan, jedwab, alginiany. Również możliwe jest wytwarzanie podłoży do rekonstrukcji ubytków o budowie włóknistej z kolagenu. Oprócz leczenia ubytków tkanki chrzęstnej i kostnej włókniste podłoża są atrakcyjnym materiałem do rekonstrukcji więzadeł i ścięgien [15]. Niemal wszystkie z ludzkich tkanek i organów osadzone są w strukturach nanowłóknistych. Kolagen jest głównym naturalnym komponentem matrycy zewnątrzkomórkowej, występuje w formie włókien o średnicy 50-500 nm. Polimerowa matryca zbudowana z nanowłókien może być identyczna z białkami matrycy zewnątrzkomórkowej zarówno pod względem składu chemicznego jak również fizycznej budowy. Dlatego nanowłókna wydają się być świetnym, biomimetycznym kandydatem na podłoża dla inżynierii tkankowej. Prowadzone są badania nad nanowłóknami z polimerów syntetycznych (PGA, PLGA, PCL) i naturalnych (kolagen, fibrynogen) dla potrzeb inżynierii tkankowej [16]. Rozwój technik otrzymywania podłoży sprawia, że możemy otrzymać rusztowanie z nanowłókien o odpowiednio ułożonej sieci porów, zaprojektowanej pod zastępowaną tkankę [17]. Oprócz nanowłókien polimerowych przeprowadzono badania nad podłożami z nanowłókien węglowych. Badania *in vitro* pokazały, że nanowłókna węglowe sprzyjają proliferacji osteoblastów oraz stymulują wzrost tkanki kostnej [18]. Zastosowanie nanowłókien węglowych może być pomocne przy próbach regeneracji różnych innych tkanek ludzkich. Nanowłókna wykorzystywane są również jako nośniki leków.

## Podziękowania

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2007 - 2010 jako projekt badawczy POL-POSTDOC III NrPBZ/MNiSW/07/2006/53.*

into synthetic polymer nanofibres (PGA, PLGA, PCL) i and natural polymer nanofibres (collagen, fibrinogen) for the requirements of tissue engineering [16]. The development of scaffold-obtaining techniques enables us to obtain a scaffold made of nanofibres with a suitably lined network of pores, designed for the tissue replaced [17]. Beside polymer nanofibres, research has been carried out into carbon nanofibre scaffolds. *In vitro* tests have shown that carbon nanofibres support the proliferation of osteoblasts and stimulate the growth of bone tissue [18]. The application of carbon nanofibres may be helpful when attempting to regenerate various other human tissues. Nanofibres are also used as drug carriers.

## Acknowledgments

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

## Piśmiennictwo

- [1] R.D. Anandjiwala "Role of Advanced Textile Materials in Healthcare", Medical Textiles and Biomaterials for Healthcare ed. by S.C. Anand, J.F.Kennedy, M.Mirafat, S.Rajendran, 2006, s. 90-98.
- [2] S.Weinberg, M.W. King "Medical Fibers and Biotextiles", Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine ed. by B.D.Ratner, A.S.Hoffman, F.J.Schoen, J.E.Lemons, Academic Press, 2004, s. 86-100.
- [3] C.C.Chu "Textile-Based Biomaterials for Surgical Application" w Polymeric Biomaterials ed by S. Dumitriu, 2002, s. 491-545.
- [4] J.V. Edwards, G.Buschle-Diller, S.C. Goheen "Modified Fibers with Medical and Specialty Applications", Springer 2005.
- [5] P. Lenartowicz "Najnowsze standardy europejskie dotyczące materiałów barierowych i masek chirurgicznych" Zakażenia (Bezpieczny szpital) 3/2004.
- [6] www.tricomed.com
- [7] <http://www.revita.com.pl/>
- [8] E. Trznadel-Budyńko, Andrzej Kaszuba „Owrzodzenia podudzi w przebiegu przewlekłej niewydolności żyłnej” Przewodnik Lekarza, 2003, 6, 11/12, s. 41-45
- [9] G.H. Altman, R.L.Horan, H.H.Lu, J.Moreau, I.Martin, J.C.Richmond, D.L.Kaplan "Silk matrix for tissue engineering anterior cruciate ligaments" Biomaterials 23, (2002), s. 4131-4141.
- [10] E. Butcher, E. Masłowski "Inteligentne włókna dla medycyny"; Przegląd Włókienniczy & Technik Włókienniczy Rocznik 53, (01/1998), s. 3 - 5.

## References

- [11] Ch. R. Meena, N. Ajmera, P. K. Sabat "Medical Textiles" <http://www.fibre2fashion.com/industry -article/pdf/4/330.pdf>
- [12] E.Bayraktar, A. Hockenberger "Usage of hollow fibres in artificial kidney" Technology and Health Care, 10 (3,4) 319 - 321, 2002
- [13] <http://www.turkstudent.net/art/235> "Medical Use of Textile Fibers"
- [14] E.Pamuła, S.Błażewicz "Badanie właściwości normowych nici węglowych na tle nici chirurgicznych powszechnego użytku" Biomateriały węglowe i ceramiczne, Ryto 1995, Wydane przez WIMiC, Kraków 1995, s. 7-14
- [15] J.A.Cooper, H.H.Lu, F.K.Ko, J.W.Freeman, C.T.Laurencin "Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and *in vitro* valuation" Biomaterials 26, (2005), s. 1523-1532.
- [16] Z.M.Huang, Y.Z.Zhang, M.Kotaki, S.Ramakrihna „A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites" Composites Science and Technology 63, (2003), s.2223-2253.
- [17] D.W.Hutmacher, A.K.Ekaputra "Design and Fabrication Principles of Electrospinning of Scaffolds" w Biomaterials Fabrications and Processing, 2008 s.115 - 137
- [18] J.L.McKenzie, M.C.Waid, R.Shi, T.J.Webster "Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials" Biomaterials 25, (2004), s. 1309-1317.
- [19] U.C.Hipler, P.Elsner "Biofunctional Textiles and Skin", Karger 2006.



# WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE I STRUKTURALNE TĘTNIĄKÓW AORTY BRZUSZNEJ

MAGDALENA KOBIELARZ<sup>1\*</sup>, SYLWIA SZOTEK<sup>1</sup>, PIOTR KUROPKA<sup>2</sup>, KATARZYNA KALETĄ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA WROCLAWSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY, ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTALNEJ, WROCLAW, POLSKA

<sup>2</sup> UNIwersytet PRZYRODNICZY WE WROCLAWIU, WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ, KATEDRA ANATOMII I HISTOLOGII, WROCLAW, POLSKA

\* E-MAIL: MAGDALENA.KOBIELARZ@PWR.WROC.PL

## Streszczenie

*W celu oszacowania prawdopodobieństwa przerwania ciągłości ściany tętniaka aorty brzusznej (AAA) konieczne jest zbadanie warunków obciążeniowych odpowiedzialnych za to zdarzenie, a także identyfikacja zmian zachodzących w strukturze ściany tego naczynia w procesie rozwoju schorzenia. Stąd, głównym celem prezentowanej pracy jest określenie mechanicznych oraz strukturalnych właściwości ścian tętniaków aorty brzusznej oraz preparatów zdrowych aort. W tym celu zastosowano test jednoosiowego rozciągania próbek wyciętych z pobranych preparatów w dwóch prostopadłych do siebie kierunkach: wzdłużnym oraz obwodowym, a także przeprowadzono histologiczne badania mikrostruktury ściany naczyń. Na podstawie przeprowadzonego testu wytrzymałościowego wykreślono krzywą naprężenie-odkształcenie dla każdego przebadanego przypadku i wyznaczono charakterystyczne wielkości opisujące wytrzymałość oraz sztywność przebadanych próbek. Uzyskane wyniki wskazują na istotny wzrost sztywności w przypadku preparatów ścian tętniaków, co szczególnie zaznaczyło się w kierunku obwodowym.*

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 98-100]

## Wprowadzenie

Tętniak aorty brzusznej jest potencjalnie śmiertelnym schorzeniem o charakterze degeneracyjnym, którego przebieg związany jest z osłabieniem ściany aorty. AAA jest istotnym problemem społecznym i klinicznym. Częstotliwość występowania tętniaka waha się na poziomie 4÷10% [1,2]. Nieleczony tętniak stale się rośnie i rozwija aż do momentu przerwania ciągłości jego ściany, co powoduje śmiertelność na poziomie 90% [3,4]. Z drugiej strony, planowe zabiegi operacyjne wycięcia tętniaka aorty brzusznej są kosztowne i związane są ze zdecydowanie niższą, ale nadal znaczącą śmiertelnością pacjentów. Wybór między zabiegiem planowego usunięcia tętniaka a zachowawczym leczeniem jest złożonym problemem, gdyż brakuje obecnie wiarygodnych wskaźników prawdopodobieństwa pęknięcia tętniaka. Maksymalna średnica tętniaka jest szeroko akceptowanym wskaźnikiem ryzyka jego pęknięcia i najczęściej używana jest w praktyce klinicznej do rekomendowania pacjentów do interwencji chirurgicznej. Jednakże, wyniki wielu badań sugerują, że pęknięcie tętniaka jest końcowym zdarzeniem, które zachodzi wówczas kiedy naprężenia przekroczą zdolność tkanki do ich przenoszenia [5]. Obniżenie wytrzymałości ściany naczynia związane jest ze zjawiskiem destrukcji i degradacji protein macierzy międzykomórkowych, tj. ela-

# MECHANICAL AND STRUCTURAL PROPERTIES OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS

MAGDALENA KOBIELARZ<sup>1\*</sup>, SYLWIA SZOTEK<sup>1</sup>, PIOTR KUROPKA<sup>2</sup>, KATARZYNA KALETĄ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL MECHANICS, WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT OF ANATOMY AND HISTOLOGY, WROCLAW, POLAND

\* E-MAIL: MAGDALENA.KOBIELARZ@PWR.WROC.PL

## Abstract

*To estimate when an abdominal aortic aneurysm (AAA) may rupture, it is necessary to understand the forces responsible for this event and structural alterations lead to changes in the mechanical properties of the tissue. Hence, the main goal of presented study is determination and assessment of mechanical and structural properties of the walls of normal abdominal aortas and abdominal aortic aneurysms. With this end in view uniaxial tensile tests of the specimens cut out from the walls of abdominal aortic aneurysms and normal abdominal aortas in two directions – longitudinal and circumferential – have been carried out and histological study has been performed. On the basis of these tests the stress-strain relationships have been determined for each investigated specimen and the maximum tangential modulus as well as the ultimate tensile strength has been assigned. The results indicate the increase of tissue stiffness in the case of abdominal aortic aneurysms, especially in the circumferential direction.*

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 98-100]

## Introduction

Abdominal aortic aneurysm is a degenerative and a potentially fatal disease which involves weakening of the aorta. AAA is a major public health problem because of its prevalence and risk of rupture. The prevalence of AAA in the general population is 4÷10% [1,2]. An untreated aneurysm will gradually grow and expand until rupture; it is an event that carries a mortality rate of 90% [3,4]. On the other hand, the elective surgical repair of an AAA is expensive and carries lower but still significant morbidity and mortality risks. The choice between elective surgical repair of AAA and conservative watchful management is a complex problem due to the lack of reliable rupture risk indicators. The maximum transverse diameter of aneurysm is a widely accepted indicator for risk of aneurysm rupture and most commonly used in clinical practice to recommend surgical intervention. However results of numerous investigations suggest that the AAA rupture is the final event that occurs when the tissue stress exceeds the tissue ability to sustain stress [5]. A key event in the reduction of aortic wall tensile strength that accompanies aneurysmal dilatation is the destruction and degradation of extracellular matrix proteins i.e. elastin and collagen [6]. Hence, we have advocated the use of a biomechanical and structural approach to predict AAA development and rupture. For this reason the main aim of this paper is to determine experimentally the mechanical

styny i kolagenu [6]. Stąd, autorzy popierają używanie biomechanicznych i strukturalnych właściwości ściany naczynia do przewidywania stopnia rozwoju i prawdopodobieństwa pęknięcia tętniaka. Z tego powodu, głównym celem tej pracy jest określenie na podstawie badań eksperymentalnych, mechanicznych i strukturalnych parametrów ścian tętniaków aorty brzusznej oraz ścian niezmiennych patologicznie preparatów aort brzusznych.

## Material i metody

Preparaty ścian tętniaka pobrano od 42 dorosłych pacjentów ( $72,5 \pm 8,0$  lat) poddanych planowemu zabiegowi wycięcia tętniaka. Natomiast preparaty ścian niezmiennych aorty brzusznej pobierano w czasie sekcji zwłok (do 24h po zgonie) od 35 denatów. Wszystkie preparaty umieszczano w roztworze soli fizjologicznej, schładzano do temperatury  $4^{\circ}\text{C}$  i poddawano badaniom w czasie jednej godziny od pobrania. Prostokątne próbki (około  $50\text{mm} \times 30\text{mm}$ ) były wycinane przy użyciu równoległościennego wykrojnika w dwóch kierunkach: obwodowym i wzdłużnym w stosunku do długiej osi nienaruszonego naczynia. Wymiary geometryczne były mierzone w sposób bezkontaktowy z zastosowaniem wideoekstensometru w czasie rzeczywistym w trakcie trwania testu mechanicznego. Testy mechaniczne prowadzono na maszynie wytrzymałościowej (MTS Synergie 100). Po wykonaniu pierwszej fazy testu, tj. obciążenia wstępnego, próbki były rozciągane aż do zniszczenia. Naprężenia Cauchy'ego i odkształcenie Green'a liczone były przy założeniu, że próbki w czasie trwania testu mechanicznego zachowują stałą objętość (ściany naczyń krwionośnych są traktowane jako materiał nieściśliwy) [7]. Maksymalny moduł styczny obliczano jako maksymalne pochylenie krzywej naprężenie-odkształcenie, natomiast maksymalną wytrzymałość wzięto jako szczytową wartość naprężenia otrzymanego przed zniszczeniem próbki. Przykładowy wykres naprężenie-odkształcenie przedstawiono na RYS. 1.

Jednocześnie, prowadzone były histologiczne badania mikrostruktury materiału badawczego. Zastosowano barwienie Verhoeff'a w celu oceny zmian patologicznych sieci włókien elastynowych dla wszystkich przebadanych preparatów.

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań, uzyskane wyniki wskazują na znaczące obniżenie sprężystości ścian tętniaków jak również obniżenie ich wytrzymałości mechanicznej, co szczególnie zaznaczyło się dla obwodowego kierunku badania. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, przy czym większość prezentowanych przez nich wniosków miała charakter pośredni. He i Roach [8] oraz Thubikar i inni [9] odnotowali, że ściany tętniaków aorty brzusznej są sztywniejsze niż ściany aorty brzusznej bez zmian patologicznych. Charakterystyki przez nich otrzymane dla ścian AAA były przesunięte w lewo w stosunku do krzywych uzyskanych dla naczyń zdrowych, ponadto nachylenie krzywej było większe – stąd wniosek o wyższej sztywności ścian tętniaków w porównaniu do zdrowej tkanki.

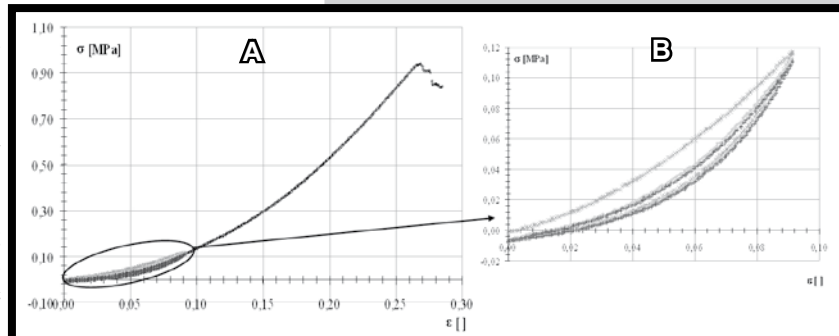
and structural properties of the walls of abdominal aortas and the walls of abdominal aortic aneurysms.

## Material and methods

Samples of aneurysm walls were harvested from 42 adult patients ( $72,5 \pm 8,0$  years) undergoing elective open AAA repair procedures. The samples of non-aneurysmal walls were collected at autopsy within 24 hours after death from 35 age-matched cadavers. All tissue specimens were placed in saline, refrigerated at  $4^{\circ}\text{C}$ , and tested within an hour of procurement. Rectangular specimens (approximately  $50\text{mm} \times 30\text{mm}$ ) were cut out by the use of a rectangular parallelepiped punch in the circumferential and longitudinal orientations with respect to the intact aorta. The geometrical dimensions were measured for each specimen in a non-contacting fashion with a videoextensometer in real time during the mechanical test. The tissue specimens were placed in a uniaxial tensile testing system (MTS Synergie 100). After a first phase, i.e. prestretching, the specimen was stretched until failure of the tissue was reached.

The Cauchy stress and the Green strain was calculated on the assumption that the volume of the specimen was conserved (the arterial wall is incompressible) [7]. The maximum tangential modulus was taken as the maximum slope of each stress-strain curve; the ultimate tensile strength was taken as the peak stress obtained before specimen failure. The representative stress-strain curve obtained from the tensile tests is shown in FIG. 1.

Simultaneously, histological evaluation of the specimens was performed. Verhoeff's elastic tissue stain was performed to assess the pathological changes in the elastin network in all the artery specimens.



**RYS. 1. A) Przykładowa zależność naprężenie-odkształcenie dla próbek wyciętej ze ściany tętniaka aorty brzusznej B) Powiększenie początkowego odcinka charakterystyki, tj. obciążenia wstępnego.**

**FIG. 1. A) The representative stress-strain relationship for the wall of abdominal aortic aneurysm. B) The enlargement of the initial part of the characteristics, the first phase of investigation, i.e. prestretching.**

## Results and discussion

On the basis of the conducted research, the obtained results indicate a significant decrease of elasticity of the walls and a decrease of mechanical strength in the case of abdominal aortic aneurysm, especially in circumferential direction. Similar results were obtained by other authors, although majority of their conclusions have been indirect. He and Roach [8] and Thubikar et al. [9] also have noted that the walls of abdominal aortic aneurysm were stiffer than the walls of abdominal aorta without pathological changes. The characteristics obtained for the walls of abdominal aortic aneurysm were shifted leftwards in comparison with the curves obtained for the walls of abdominal aorta and the slope of the curves was higher. Goodal et al. [10] showed that abdominal aortic aneurysm was the effect of systemic disease, which affects the whole vascular system and is characterized by an increase of stiffness of the

Goodal i inni [10] wskazali, że tętniaki aorty brzusznej są wynikiem ogólnoustrojowej choroby, która dotyka całego systemu krwionośnego i jest charakteryzowana poprzez wzrost sztywności ścian naczyń. Wielu autorów, podobnie jak autorzy, obserwuje obniżenie koncentracji elastyny w ścianie tętniaka aorty brzusznej w porównaniu do ściany zdrowego naczynia [7,8,10,11]. Na podstawie przeprowadzonych badań i otrzymanych wyników, możliwe jest stwierdzenie, że w procesie rozwoju tętniaka, włókna elastynowe ulegają degradacji, która skutkuje obniżeniem wytrzymałości ściany naczynia oraz wzrostem jego sztywności.

## Piśmiennictwo

- [1] Ceniga M., et al. Growth rate and associated factors in small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2006; 31: 231-236.  
 [2] Lindholt J.S., et al. Immunoglobulin A antibodies against Chlamydia pneumoniae are associated with expansion of abdominal aortic aneurysm. *British Journal of Surgery*, 1999; 86: 634-638.  
 [3] Hans SS, et al. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J. Vascular Surgery*, 2005; 41: 584-588.  
 [4] Vorp D.A., Geest J.P.V. Biomechanical determinants of abdominal Aortic aneurysm rupture. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005; 25: 1558-1566.  
 [5] Martino E.S.D., et al. Biomechanical properties of ruptured versus electively repaired abdominal aortic aneurysm wall tissue. *Journal of Vascular Surgery*, 2006; 43: 570-576.  
 [6] Choke E., et al. Review of biological factors implicated in Abdominal aortic aneurysm rupture. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2005; 30: 227-244.

walls of vessels. Many authors, similarly like in presented study, have noted a loss of elastin in the wall of abdominal aortic aneurysm in comparison with the wall of a healthy abdominal aorta [7,8,10,11]. On the basis of the obtained results, it can be stated that in the process of aneurysm development elastin fibres undergo degradation, which results in a decrease of mechanical strength of a vessel and an increase of stiffness of the aortic wall.

## References

- [7] Raghavan M., Webster M., Vorp D. Ex vivo biomechanical behaviour of abdominal aortic aneurysm: assessment using a new mathematical model. *Annals of Biomedical Engineering*, 1996; 24: 573-582.  
 [8] He C.M., Roach M.R. The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 1994; 20: 6-13.  
 [9] Thubrikar M.J., et al. Mechanical properties of abdominal aortic aneurysm wall. *Journal of Medical Engineering & Technology*, 2001; 25: 133-142.  
 [10] Goodall S., et al. The association between venous structural alterations and biomechanical weakness in patients with abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 2002; 35: 937-942.  
 [11] Vorp D.A., Raghavan M.L., Webster M.W. Mechanical wall stress in abdominal aortic aneurysm: influence of diameter. *Journal of Vascular Surgery*, 1998; 27: 632-639.

## BADANIE BIOZGODNOŚCI KOMÓRKOWEJ IN VITRO NANOSTRUKTURALNYCH ELASTOMERÓW TERMOPLASTYCZNYCH DLA IMPLANTÓW TKANKI MIĘKKIEJ

M. EL FRAY\*, M. PIĄTEK

POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW, ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH, UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN, POLSKA

\* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

### Streszczenie

Obiektem badań były nanostrukturalne elastomery termoplastyczne typu (A-B)<sub>n</sub> zawierające segmenty giętkie pochodzące od dimeru kwasu linoleinowego (DLA) i segmenty sztywne zawierające poli(tereftalan butylenu) (PBT). Te nowe biomateriały proponowane są jako alternatywa dla elastomeru silikonowego w zastosowaniach na implanty piersi. Struktura, a tym samym właściwości kopolimerów zostały poddane modyfikacji wiązką szybkich elektronów. Stwierdzono, że kopolimer poddany działaniu dawki 100kGy wykazał lepszą proliferację komórek w porównaniu do materiału niemodyfikowanego i elastomeru silikonowego użytego jako materiał odniesienia. Promieniowanie jonizujące wpłynęło również pozytywnie na właściwości mechaniczne zwiększając o 100% wartość modułu Young'a w porównaniu do elastomeru silikonowego o jakości medycznej.

**Słowa kluczowe:** Elastomery termoplastyczne, biouzgodność komórkowa in vitro, promieniowanie jonizujące [Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 100-103]

## IN VITRO CELL BIOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURED THERMOPLASTIC ELASTOMERS FOR SOFT TISSUE IMPLANTS

M. EL FRAY\*, M. PIĄTEK

SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE, DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES, 10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND

\* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

### Abstract

Nanostructured multiblock thermoplastic elastomers of the (A-B)<sub>n</sub> type with aliphatic segments from dimer of linoleic acid (DLA) and aromatic segments of poly(butylene terephthalate) (PBT) were investigated in this work. These new materials are proposed as an alternative to silicone elastomer for breast implants. Their structure, and thus properties were modified with e-beam radiation. It was found that polymer exposed to 100 kGy showed better cell proliferation as compared to unmodified material and to silicone elastomer used as reference material. E-beam radiation enhanced also mechanical properties by over 100% increase of Young's modulus as compared to medical grade silicone elastomer.

**Keywords:** Thermoplastic elastomers, in vitro cell biocompatibility, e-beam radiation.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 100-103]

## Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania implantowanymi biomateriałami o polepszonych właściwościach mechanicznych i biologicznych. Materiały dotychczas stosowane jako implanty piersi nie zawsze spełniały wymagania „idealnego” implantu z powodu kurczenia się implantów lub rozerwania polimerowej powłoki [1,2]. Dlatego wciąż poszukuje się nowych polimerów o lepszych właściwościach pod względem zachowania się w żywym organizmie i ich biofunkcjonalności.

W prezentowanej pracy zbadano nowe materiały modyfikowane promieniowaniem jonizującym. Poli(alifatyczno/aromatyczne-estry) (PED) są nanostrukturalnymi elastomerami termoplastycznymi wykazującymi biogodność *in vitro* i *in vivo* [3-5], i oczekuje się, że modyfikacja promieniowaniem jonizującym poprawi ich właściwości mechaniczne. Kopolimery PED zbudowane są z segmentów sztywnych takich jak w poli(tereftalanie butylenu) PBT, natomiast segmenty giętkie zbudowane są z estrów utworzonych przez 1,4-butanediol (1,4-BD) i dimeryzowany kwas lioleinowy (DLA). Przy małym udziale segmentów sztywnych (do 40% wag.) są one miękkie i przezroczyste.

Kopolimery modyfikowano wiązką szybkich elektronów o różnej dawce, odpowiednio 25, 50, 75 i 100kGy. Zbadano ich właściwości fizyko-chemiczne i mechaniczne oraz oceniono biogodność komórkową.

## Materiały i metody

Synteza poli(alifatyczno/aromatycznych-estrów) (PED) odbywała się w reakcji transestryfikacji i polikondensacji w stopie, którą opisano we wcześniejszych publikacjach [6,7]. Badaniom poddano kopolimer zawierający 70% wag. segmentów giętkich i 30% wag. segmentów sztywnych.

Próbki były napromieniane w temperaturze otoczenia strumieniem wysokoenergetycznych elektronów generowanych w liniowym akceleratorze elektronów Elektronika 10/10 do wskazanych dawek (25, 50, 75 i 100kGy).

Frakcję żelową usieciowanych kopolimerów oznaczono metodą ekstrakcyjną. Próbki kopolimerów w postaci rozdrobionych folii (0,1-0,2 g) umieszczono w tyglach Schotta typu P2 i poddano ekstrakcji we wrzącym tetrahydrofuranie (100cm<sup>3</sup>) pod chłodnicą zwrotną w ciągu 3 godzin. Po ekstrakcji próbki suszono w suszarce próżniowej w 60°C w ciągu 3 godzin. Dla każdej dawki wykonano 3 oznaczenia. Zawartość frakcji żelowych obliczono ze wzoru (1) jako wartość średnią z trzech pomiarów:

$$X = m_1/m_0 \cdot 100\% \quad (1)$$

gdzie:  $m_1$  – masa wysuszonej próbki po ekstrakcji

$m_0$  – masa próbki przed ekstrakcją

Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) wykonana została na aparacie TA Instruments (DSC Q100). Próbki były suszone pod próżnią w 60°C i trzymane w desykatytorze. Proces był prowadzony w trzech cyklach: pierwsze grzanie, następnie chłodzenie, i drugie grzanie w zakresie temperatur od – 100°C do temperatury 50°C powyżej temperatury topnienia dla każdego materiału. Proces grzania i chłodzenia prowadzony był z szybkością 10°C min<sup>-1</sup>.

Badania wytrzymałościowe wykonywano w temperaturze pokojowej przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Instron TM-M z głowicą 500N i szybkością przesuwu szczepek 100mm/min. Początkowy rozstaw szczepek wynosił 25mm. Wynik uśredniono z 6 wioselek o przekroju 0,5x4mm.

Masę cząsteczkową ( $M_n$ ,  $M_w$ ) i stopień polidispersyjności ( $M_w/M_n$ ) kopolimerów wyznaczono metodą GPC SEC firmy Waters wykorzystując system sześciu kolumn Styragel-HR columns (106, 105, 104, 103, 500, and 100\_AA), termosta-

## Introduction

Over the recent years, an increasing interest on implantable biomaterials with improved mechanical and biological properties is observed. Materials used for breast implants nowadays do not always fulfill all the requirements of “ideal” implant, since capsule contracture and implant shell rupture are major problems [1,2]. Therefore, many efforts are continuously made to produce better materials in term of enhanced performance and biofunctionality.

In this work, new materials modified with e-beam radiation are investigated. Poly(aliphatic/aromatic-ester)s (PED) are nanostructured thermoplastic elastomers which showed biocompatibility *in vitro* and *in vivo* [3-5], and it is expected that after ionizing radiation, their mechanical properties will be improved. PEDs are composed of hard segments as in poly(butylene terephthalate) PBT and soft segments derived from 1,4-butanediol (1,4-BD) and unsaturated dimer of linoleic acid (DLA). At very low concentration of hard segments (up to 40wt%), very soft and transparent materials are produced.

Materials were modified with different radiation doses of ionizing energy, namely 25, 50, 75 and 100kGy. Their physico-chemical and mechanical properties were evaluated and *in vitro* cell biocompatibility was investigated in this work.

## Experimental and methods

The synthesis method of poly(aliphatic/aromatic-ester) (PED) copolymer, involving transesterification and polycondensation from the melt, was described in previous publications [6,7]. The PED copolymer containing 70wt% soft segments and 30 wt% hard segments was used for the experiments.

Samples of copolymers were irradiated at ambient temperature with a high energy electron beam generated in a linear electron accelerator Elektronika 10/10 to indicated doses.

Gel fraction was calculated from the extraction method. Small pieces of polymer foils (0.1-0.2g) were placed in Schott's crucibles P2 type and extracted from boiling THF (100cm<sup>3</sup>) during 3h. Samples were then dried and weighted in order to calculate the gel fraction as in formula (1):

$$X = m_1/m_0 \cdot 100\% \quad (1)$$

where:  $m_1$  – mass of dried sample after extraction

$m_0$  – mass of sample before extraction

Differential scanning calorimetry (DSC) scans were performed with a TA Instruments (DSC Q100) apparatus. The samples were dried in vacuum at 60°C, and then kept in a desiccator. The process was carried out in a triple cycle: first heating, then cooling, and second heating in the temperature range from –100°C to 50°C higher than melting point of each copolymer. The rate of heating and cooling was 10°C min<sup>-1</sup>.

The quasi-static tensile data were collected at room temperature with an Instron TM-M tensile tester equipped with a 500N load cell employing a crosshead speed of 100 mm/min. The starting clamp distance was 25mm. The obtained results were averaged from 6 specimens with cross section of 0.5x4mm.

The molecular weight ( $M_n$ ,  $M_w$ ) and molecular weight distribution ( $M_w/M_n$ ) of the block copolymers were determined by size exclusion chromatography (SEC) using a Waters system equipped with six Styragel-HR columns (106, 105, 104, 103, 500, and 100\_AA pore sizes), thermostated at 35°C, a Waters 410 DRI detector thermostated at 40°C, a Dawn DSP 18 angle laser light scattering detector (MALLS)

towanych w 35°C, detector Waters 410 DRI termostatowany w 40°C, system 18 detektorów rozpraszających światło (MALLS) (Wyatt Technology), Waters 996 detektor UV. Próbkę polimerów rozpuszczono w THF.

Badania cytokompatybilności in vitro wykonano zgodnie z ISO 10 993-5. Wycięto okrągłe krążki z błon polimerowych o średnicy 15 mm, sterylizowano tlenkiem etylenu (EtO) i umieszczano w 24 dołkowych płytkach (Greiner). Fibroblasty mysie L-929 (DSMZ, Braunschweig) wysiewano w ilości  $1.0 \times 10^5$  komórek/ml na 24 godziny, w środowisku 90% RPMI 1640 (GIBCO) uzupełnionym 10% serum surowicy bydlęcej (GIBCO) i 1% Penstrep (GIBCO). Komórki były hodowane w 37°C w nawilżanej atmosferze (RH=95%) i 5% CO<sub>2</sub>. Zastosowano test WST-1 do oszacowania aktywności mitochondrialnej komórek. Komórki były enzymatycznie odklejane przez trypsynizację (0.25% trypsyna in EDTA, Sigma) i zliczane przez zliczanie komórek (Beckman, Coulter Z2). Wykonano cztery pomiary dla każdego materiału. Wyniki testu porównano z wartościami polistyrenu jako kontroli. Wykonano analizę wariancyjną (test ANOVA) i przyjęto poziom istotności przy 0.001 > p.

## Wyniki i dyskusja

Zsyntezowane polimery PED oraz próbki poddane modyfikacji scharakteryzowano za pomocą granicznej liczby lepkościowej i oznaczeń mas cząsteczkowych, a wyniki przedstawiono w TABELI 1. Jak wynika z TABELI 1, wzrost dawki promieniowania prowadzi do wzrostu zarówno lepkości jak i mas cząsteczkowych polimerów. Wiadomo, że promieniowanie jonizujące jest jedną z metod sieciowania polimerów, dlatego oznaczono również zawartość frakcji żelowej. Wyniki przedstawione w TABELI 1 wskazują, że ekspozycja materiału na dawkę 100kGy znacząco wpływa na zawartość frakcji żelowej, która wynosi ponad 50%. Tłumaczy to zatem obserwowany wzrost lepkości i mas cząsteczkowych z rosnącą dawką promieniowania. Podobne obserwacje nasuwają się podczas analizy wyników badań mechanicznych: materiał poddany dawce 100 kGy wykazuje wzrost wartości naprężenia przy zerwaniu i ponad dwukrotnie wyższą wartość modułu Younga w porównaniu do elastomeru silikonowego (TABELA 1). Wyniki badań mechanicznych mogą zatem sugerować, że tak zmodyfikowany materiał jest znacznie lepszy pod względem wartości  $E_{mod}$  w porównaniu do materiałów stosowanych obecnie na implanty piersi.

Za tworzeniem się dwojakiem rodzaju wiązań: fizycznych (natywnych) i chemicznych (po napromienianiu) przemawiają również wyniki analizy termicznej (DSC). Kopolimery PED są elastomerami termoplastycznymi wykazującymi niskotemperaturową przemianę zeszczenia ( $T_g$ ) oraz wysokotemperaturowe topnienie ( $T_m$ ), jak to pokazano na RYS. 1. Ta natywna „fizycznie usieciowana” struktura polimeru ulega modyfikacji po dawce promieniowania jonizującego na co wskazuje mocne obniżenie w kierunku niższych temperatur wartości  $T_g$  po dawce 100kGy. Jest to wyraźna oznaka utworzenia się dodatkowej sieci wiązań chemicznych w obszarach amorficznych segmentów giętkich.

**TABELA 1. Skład i wybrane właściwości kopolimerów PED. X–frakcja żelowa,  $[\eta]$ –graniczna liczba lepkościowa,  $M_n$ ,  $M_w$ –liczbowo i wagowo średni ciężar cząsteczkowy,  $M_w/M_n$ –stopień polydispersyjności,  $\sigma_r$ –naprężenie zrywające,  $\epsilon_r$ –wydłużenie przy zerwaniu,  $E_{mod}$  – moduł Younga.**

**TABLE 1. Composition and selected properties of PED copolymers.**

**X–gel graction,  $[\eta]$ – limiting viscosity number,  $M_n$ ,  $M_w$ –molecular weight,  $M_w/M_n$ –molecular weight distribution,  $\sigma_r$ –tensile stress,  $\epsilon_r$ –elongation at break,  $E_{mod}$ –Young's modulus.**

Lp.	Materiał	Dawka [kGy]	X [%]	$[\eta]$ [dl/g]	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$M_w/M_n$ n	$\sigma_r$ [MPa]	$\epsilon_r$ [%]	$E_{mod}$ [MPa]
1	PBT/DLA			0,998	5556	12610	2,27	8,48	1181	5,10
2	PBT/DLA	25		1,001	47940	77050	1,60	8,54	1183	4,54
3	PBT/DLA	50	29,6	1,059	22110	48590	2,20	8,77	1234	4,08
4	PBT/DLA	75		1,133	32780	69290	2,11	8,86	1237	4,11
5	PBT/DLA	100	51,4	1,307	102800	182200	1,80	9,61	1223	5,69
6	SILICONE							12,3	1005	2,53

(Wyatt Technology), and a Waters 996 UV detector. The mobile phase for the SEC was THF at 1 ml/min, continuously distilled off CaH<sub>2</sub> and recirculated.

The in vitro cytocompatibility investigations were carried out according to ISO 10 993-5. Polymer films were stamped into round disks of 15mm diameter, sterilized by the ethylene oxide (EtO) and placed in 24-well plates (Greiner) serving as positive control. L-929 mouse fibroblasts (DSMZ, Braunschweig) were seeded at  $1.0 \times 10^5$  cells/ml for the 24 hour test in 90% RPMI 1640 medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% Penstrep (GIBCO). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere (RH=95%) and 5% CO<sub>2</sub>. The WST-1 test assay was used to estimate the mitochondrial activity of the cells. The cells were enzymatically detached by trypsination (0.25% trypsin in EDTA, Sigma) and counted with a cell counter (Beckman, Coulter Z2). Four measurements on each material were performed. The test results were evaluated as percentage of the values received with polystyrene. Analysis of variance (one-way ANOVA) was performed and differences considered highly significant at 0.001 > p.

## Results and discussion

The synthesized PED materials were characterized by limiting viscosity number and gel permeation chromatography and results are summarized in TABLE 1. It can be noticed that increasing radiation dose increases polymer viscosity and molecular mass. Since e-beam radiation can induce cross-linking, the cross-links density was also determined. As can be also seen from TABLE 1, radiation dose of 100kGy increases significantly crosslinks density up to 51,4%. This explains significant increase of limiting viscosity number and molecular weight of this material. The same observation was made when results of mechanical testing were analyzed: material exposed to 100kGy e-beam radiation showed increased tensile strength and more importantly, over two fold increase of Young's modulus as compared to silicone elastomer (TABLE 1). Resulted mechanical properties are higher in  $E_{mod}$  values as compared to material used nowadays for breast implants.

Formation of a double physical (native) and chemical network (after modification) and manifested by changes of physical and mechanical properties, was also investigated by differential scanning calorimetry (DSC). PED materials

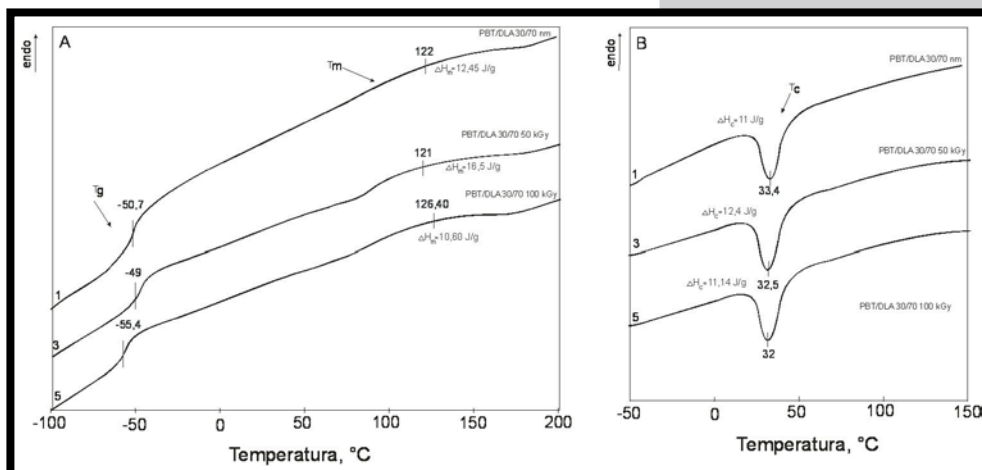
are thermoplastic elastomers showing low temperature glass transition ( $T_g$ ) and high temperature melting ( $T_m$ ) as can be seen from FIGURE 1. This „physically crosslinked” polymer structure is modified after exposure to e-beam as demonstrated by significant shift of  $T_g$  toward lower temperature after 100KGy dose. This clearly indicates that additional chemical network within soft amorphous phase is formed.

The results of cell cytotoxicity of PED material after exposure to 100kGy is presented in FIGURE 2. Investigated material showed higher values of cell proliferation as compared to unmodified PED material and to silicone elastomer. This observation again confirms that e-beam radiation

is enhancing PED material properties thus making it as very promising candidate for soft tissue implants.

## Conclusions

Nanostructured PED thermoplastic elastomers were synthesized and subjected to e-beam radiation. The results of physical and thermal characterization revealed formation of a double physical and chemical network structure providing enhanced mechanical properties. The ionizing radiation enhances also cell proliferation, thus making the PED material exposed to 100kGy radiation dose a very promising candidate to soft tissue implants (e.g. as material for breast implants).



**RYS. 1. Krzywe DSC grzania (A) i chłodzenia (B) kopolimerów PED modyfikowanych promieniowaniem jonizującym. Numery krzywych odpowiadają numerom próbek w TABELI 1.**

**FIG. 1. DSC curves of PED copolymers during heating (A) and cooling (B) modified with e-beam radiation. Numbers of curves correspond to the numbers of samples in TABLE 1.**

Wyniki biologiczności komórkowej polimerów PED po dawce 100kGy przedstawiono na RYS.2. Badany materiał wykazał wyższy procent proliferacji komórek w porównaniu do materiału niemodyfikowanego i elastomeru silikonowego o jakości medycznej wskazując na duży potencjał stosowania tego materiału jako implant tkanek miękkich.

## Wnioski

Nanostrukturalne elastomery termoplastyczne (TPE) zostały zsyntezowane i poddane napromienianiu dawką szybkich elektronów. Wyniki badań fizycznych i termicznych wskazują na utworzenie się podwójnej sieci wiązań fizycznych i chemicznych wpływającej na polepszenie właściwości mechanicznych. Modyfikacja szybkimi elektronami wpływa również na proliferację komórek, stąd też polimer poddany modyfikacji dawką 100kGy jest bardzo obiecującym materiałem na implanty tkanek miękkich (np. na implanty piersi).

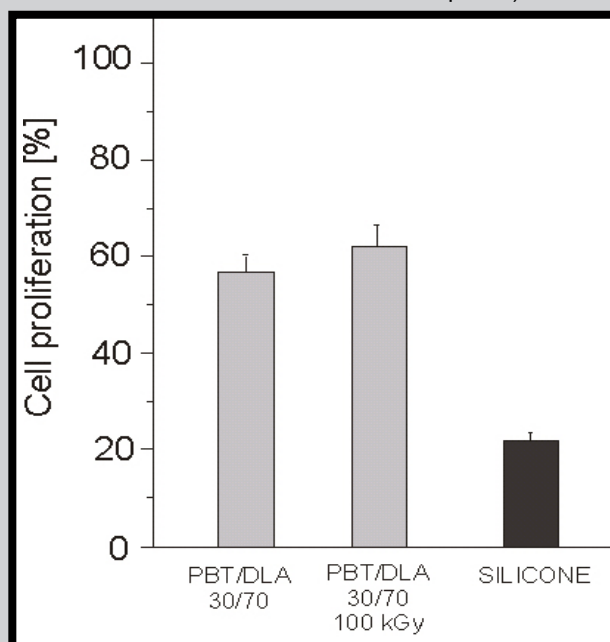
## Podziękowania

Prace były finansowane w ramach projektu DWM/18/POL/2005.

## Piśmiennictwo

- [1] E.G. Wilkins EG, et al, Journal of the American Cancer Society 1995; 180(2), 177.
- [2] S.E. Ong, S. Zhang, H. Du, H.C. Too, K.N. Aung. Biomaterials 2007; 28, 4033.
- [3] M. El Fray, A. Bartkowiak, P. Prowans, J. Slonecki. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2000, 11, 757.
- [4] P. Prowans, M. El Fray, J. Slonecki, Biomaterials, 2002, 23, 2973.
- [5] M. Renke-Gluszko, M. El Fray, Biomaterials, 2004, 25, 5191.
- [6] M. El Fray, J. Slonecki. Angew. Mikromol. Chemie, 1996, 234, 103.
- [7] M. El Fray, M. Piątek, G. Przybytniak. Elastomery, 2007, 11, 20.

## References



**RYS. 2. Proliferacja komórek (fibroblasty L-929, 24h) na powierzchni niemodyfikowanego kopolimeru PED, modyfikowanego promieniowaniem jonizującym (100kGy) oraz elastomeru silikonowego o jakości medycznej.**

**FIG. 2. Cell proliferation (L-929 fibroblasts, 24h) on the neat PED copolymer, modified with e-beam radiation (100kGy) and medical grade silicone.**

## Acknowledgements

This work has been financed from the research project DWM/18/POL/2005.

# WPŁYW WYSOKOENERGETYCZ- NEGO PROMIENIOWANIA NA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓW ZAWIERAJĄCYCH NANONAPEŁNIACZE

M. PIĄTEK<sup>1</sup>, M. EL FRAY<sup>1\*</sup>, G. PRZYBYTNIK<sup>2</sup>, M. WALO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA SZCZECIŃSKA, INSTYTUT POLIMERÓW,  
ZAKŁAD BIOMATERIAŁÓW I TECHNOLOGII MIKROBIOLOGICZNYCH,  
UL. PUŁASKIEGO 10, 70-322 SZCZECIN, POLSKA

<sup>2</sup> INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,  
UL. DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA, POLSKA

\* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

## Streszczenie

Obiektem badań były multiblokowe kopoliestry (A-B)<sub>n</sub> zbudowane z alifatycznych segmentów pochodzących od dimeru kwasu dilinoleinowego (stąd nazywanego również kwasem dilinoleinowym) (DLA) i aromatycznych segmentów zawierających poli(tereftalan butylenu) (PBT). Materiały te wykazały wcześniej doskonałą biokompatybilność i są obiecujące do zastosowań w medycynie. W pracy przedstawiono wpływ dwójakiego rodzaju modyfikacji struktury kopolimerów PED na właściwości chemiczne i mechaniczne. Polimery były modyfikowane nanocząstkami SiO<sub>2</sub> lub TiO<sub>2</sub> i dawką promieniowania jonizującego. Stwierdzono wystąpienie dwóch konkurencyjnych reakcji rodników alkilowych – degradację oksydacyjną i sieciowanie. Drugi z procesów zachodzi wydajniej dla PBT/DLA i PBT/DLA+SiO<sub>2</sub>, natomiast zużycie tlenu jest większe dla PBT/DLA+TiO<sub>2</sub>.

[Inżynieria Biomateriałów, 81-84, (2008), 104-107]

## Wstęp

Polimerowe biomateriały muszą spełniać wiele wymagań dotyczących nie tylko biokompatybilności, lecz również specyficznych właściwości mechanicznych. Dlatego ostatnio są one coraz częściej wytwarzane w formie kopolimerów blokowych lub multiblokowych, w których poprzez zmiany udziału poszczególnych bloków można regulować ich właściwości w szerokim zakresie. Co więcej, ich właściwości mogą być modyfikowane różnymi nanonapełniaczami, takimi jak hydroksyapatyty, TiO<sub>2</sub> lub SiO<sub>2</sub> [1,2]. Biorąc pod uwagę fakt, że promieniowanie jonizujące jest jedną z metod sterylizacji biomateriałów, można również stosować tę metodę do modyfikacji właściwości materiałów, zwłaszcza właściwości mechanicznych przy wyższych dawkach promieniowania.

W pracy przedstawiono wyniki badań chemicznych i mechanicznych kopolimerów multiblokowych (PED) zbudowanych z reszt poli(tereftalanu butylenu)(PBT) i sekwencji dimeru kwasu linoleinowego (stąd nazywanego też kwasem dilinoleinowym)(DLA) zawierających nanometryczne cząstki nieorganiczne i modyfikowane wysoką dawką promieniowania jonizującego.

## Materiały i metody

Synteza kopolimerów poli(alifatyczno/aromatycznych estrów) (PED) odbywała się w reakcji transestryfikacji i

# THE EFFECT OF HIGH ENERGY RADIATION ON NANOCOMPOSITE-BASED BIOMATERIALS

M. PIĄTEK<sup>1</sup>, M. EL FRAY<sup>1\*</sup>, G. PRZYBYTNIK<sup>2</sup>, M. WALO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE,  
DIVISION OF BIOMATERIALS AND MICROBIOLOGICAL TECHNOLOGIES,  
10 PUŁASKIEGO STR., 70-322 SZCZECIN, POLAND

<sup>2</sup> INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,  
16 DORODNA STR., 03-195 WARSZAWA, POLAND

\* E-MAIL: MIRFRAY@PS.PL

## Abstract

An objective of this work were multiblock-polyester materials of the (A-B)<sub>n</sub> type with aliphatic segments from dimer of linoleic (hence: dilinoleic) acid (DLA) and aromatic segments containing poly(butylene terephthalate) (PBT). These materials showed already excellent biocompatibility and are promising for medical applications. In this work, the influence of simultaneous double modification of the native structure of PED materials on their chemical and mechanical properties was investigated. Polymers were modified with nanometric SiO<sub>2</sub> or TiO<sub>2</sub> and exposed to ionizing radiation at different doses. Two competitive reactions of alkyl radicals were confirmed – oxidative degradation and crosslinking. The later process was more efficient for PBT/DLA and PBT/DLA+SiO<sub>2</sub>, whereas uptake of oxygen was higher in PBT/DLA+TiO<sub>2</sub>.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 104-107]

## Introduction

Polymeric biomaterials have to fulfill many requirements including biocompatibility as well as specific mechanical properties. Therefore, they often are prepared as block and multiblock copolymers since different concentration of various blocks allows to tailor their properties over a wide composition range. Additionally, their properties can be modified by adding different nanofillers, including hydroxyapatite, TiO<sub>2</sub> or SiO<sub>2</sub> [1,2]. Since ionising radiation is one of the sterilization methods for biomaterials, it can also be used as useful method for modification of their mechanical properties at higher radiation doses.

In this work, we present the results of chemical and mechanical characterization of multiblock copolymers (PED) composed of poly(butylene terephthalate) (PBT) and dimer of linoleic (hence: dilinoleic) acid (DLA) containing nanometric inorganic particles and exposed to high dose of e-beam radiation.

## Experimental and methods

The synthesis method of poly(aliphatic/aromatic-ester) (PED) copolymer, involving transesterification and polycondensation in the melt, was described in previous publications [3,4]. The copolymer PED containing 70wt% soft segments and 30 wt% hard segments (sample A) was modified with 0,2 wt% nanometric SiO<sub>2</sub> (B) and nanocrystalline TiO<sub>2</sub> (C) (Degussa, Germany).

Samples of copolymers were irradiated with 100kGy radiation dose at ambient temperature with a high energy

polikondensacji w stopie, którą opisano we wcześniejszych publikacjach [3,4]. Kopolimer PED zbudowany z 70% wag segmentów giętkich otrzymano jako niemodyfikowany (A) oraz modyfikowany w ilości 0,2% wag  $\text{SiO}_2$  (C) i  $\text{TiO}_2$  (D) (Degussa, Germany).

Próbki były napromieniowane dawką 100kGy w temperaturze otoczenia strumieniem wysokoenergetycznych elektronów generowanych w liniowym akceleratorze elektronów Elektronika 10/10.

Wydajność radiacyjna wodoru  $\text{G}(\text{H}_2)$  oraz zużycie tlenu z przestrzeni wypełniającej naczynko z próbką  $\text{G}(-\text{O}_2)$  oznaczono stosując chromatograf gazowy Shimadzu-14B. Detekcję gazów przeprowadzono metodą termokonduktywności.

Kopolimery badane metodą EPR poddano ekspozycji na działanie promieniowania gamma w źródle  $^{60}\text{Co}$  o mocy dawki 1,2kGy/h. Widma EPR mierzono z wykorzystaniem spektrometru Bruker ESP 300 z wnęką prostokątną TE 102.

Badania wytrzymałościowe wykonywano w temperaturze pokojowej przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Instron TM-M z głowicą 500N i szybkością przesuwu szczęk 100 mm/min. Początkowy rozstaw szczęk wynosił 25mm. Wynik uśredniono z 6 wiosełek o przekroju 0,5x4mm.

## Wyniki i dyskusja

Oznaczona metodą chromatografii gazowej wydajność radiacyjna wodoru  $\text{G}(\text{H}_2)$  kopolimerów PED jest stosunkowo mała i waha się w granicach 0.070–0,059 $\mu\text{mol}/\text{J}$  (RYS. 1) związane to jest z obecnością w strukturze polimerów grup aromatycznych. Po modyfikacji  $\text{SiO}_2$  i  $\text{TiO}_2$  konsumpcja wodoru ulega zmniejszeniu. Konsumpcja tlenu jest znacznie większa w przypadku kopolimerów PED modyfikowanych nanonapełniaczami, jednak w przypadku zastosowania  $\text{TiO}_2$  wartość ta jest dwukrotnie większa niż przy użyciu  $\text{SiO}_2$  (RYS. 2). Aby zwiększyć działanie antyoksydacyjne i w konsekwencji doprowadzić do istotnego ograniczenia procesów utleniania, które są powodem szybszej degradacji, w kopolimerach modyfikowanych  $\text{SiO}_2$  i  $\text{TiO}_2$ , co w odniesieniu do przyszłych zastosowań biomedycznych tych materiałów, konieczne jest zastosowanie antyutleniaczy.

Procesy rodnikowe zachodzące w kopolimerach pod wpływem napromieniowania w temperaturze otoczenia strumieniem wysokoenergetycznych elektronów mogą być monitorowane za pomocą spektroskopii EPR, RYS. 3. Widma kopolimerów PBT/DLA niemodyfikowanego (RYS. 3A) i modyfikowanego  $\text{SiO}_2$  (RYS. 3B) otrzymane w 77K mają postać wąskiego singletu i wskazują na obecność rodników z centrum zlokalizowanym na heteroatomie utworzonych w wyniku pęknięć łańcucha głównego. Sygnał ten można obserwować nawet w 150K, a zatem nie powstaje on w wyniku absorpcji nietrwałych jonowych produktów rodnikowych zanikających zwykle w niższych temperaturach. Stąd można wnioskować, że wiązania pomiędzy łańcuchami powstają albo już podczas napromieniowania, lub są związane z produktami następczymi rodników obserwowanych metodą EPR. Widmo uzyskane po ogrzaniu próbki do 180K wykazuje charakterystyczny kształt sygnału rodnika nadtlenowego powstającego w trakcie konkurencyjnego procesu utleniania. Dalsze podnoszenie temperatury powoduje zanik rodnika nadtlenowego, związane to jest z większą ruchliwością łańcucha kopolimerów podczas przejścia szklistego.

Wyniki badań mechanicznych wyjściowego kopolimeru PED (A), PED napromienianego dawką

electron beam generated in a linear electron accelerator Elektronika 10/10.

The radiation yields of hydrogen  $\text{G}(\text{H}_2)$  abstracted from polymers together with consumption of oxygen from the space above samples  $\text{G}(-\text{O}_2)$  were determined with a gas chromatograph Shimadzu – 14B. The thermoconductivity method was used for detection of the gases.

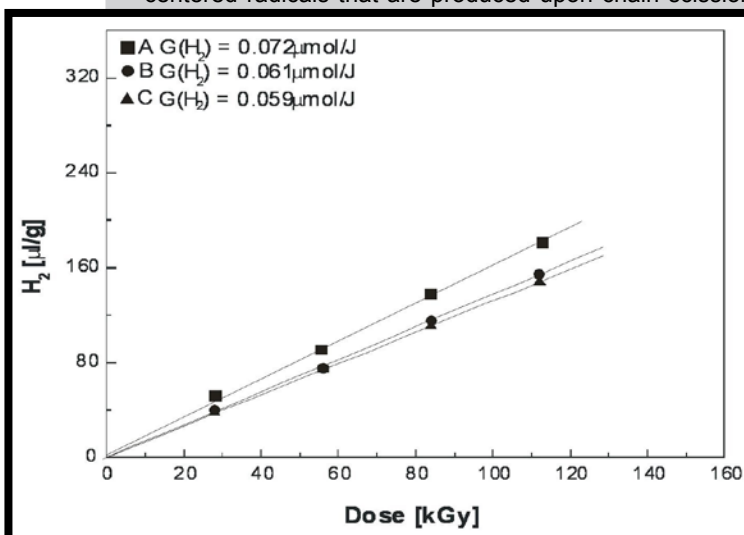
The copolymer studied by EPR method was irradiated by gamma rays in  $^{60}\text{Co}$  source Issledovatel (dose rate 1.2kGy/h) EPR spectra were recorded using a Bruker ESP 300 spectrometer with rectangular cavity TE 102.

The quasi-static tensile data were collected at room temperature with an Instron TM-M tensile tester equipped with a 500N load cell employing a crosshead speed of 100mm/min. The starting clamp distance was 25mm. The obtained results were averaged from 6 specimens with cross section of 0.5x4mm.

## Results and discussion

The radiation efficiency of hydrogen  $\text{G}(\text{H}_2)$  of PED copolymers as determined by gas-chromatography is relatively small and was in a range of 0.070–0,059 $\mu\text{mol}/\text{J}$  (FIG. 1) and can be explained by the presence of aromatic groups in the polymer structure [5] After modification with  $\text{SiO}_2$  and  $\text{TiO}_2$  the consumption of hydrogen is diminished. On the other hand, the oxygen consumption is considerably higher for PED copolymers modified with nanofillers, however in case of  $\text{TiO}_2$  this value is two times higher as compared to  $\text{SiO}_2$  (FIG. 2). To enhance the antioxidative activity and consequently to limit the oxidation processes being a main reason of faster degradation, there is a need to introduce antioxidants for copolymers modified with  $\text{SiO}_2$  and  $\text{TiO}_2$ , especially if materials are aimed to be used in biomedical applications.

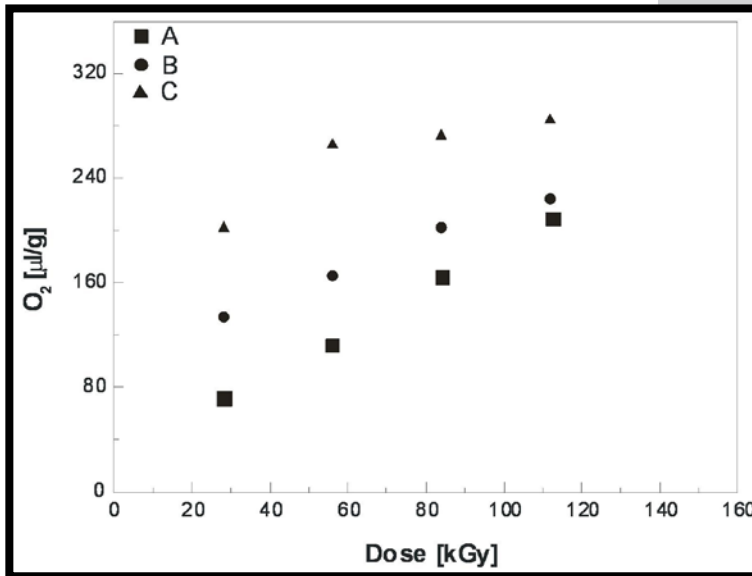
The radical processes occurring in copolymers being irradiated at ambient temperature with a high energy electron beam can be monitored by EPR technique as illustrated in FIG. 3. The spectrum of non modified PBT/DLA copolymer (FIG. 3A) and modified with  $\text{SiO}_2$  (FIG. 3B) detected at 77K as a sharp singlet indicates the presence of heteroatom centered radicals that are produced upon chain scission.



RYS. 1. Wydajność radiacyjna wodoru: (A) - PBT/DLA 30/70, (B) - PBT/DLA 30/70+0,2% $\text{SiO}_2$ , (C) - PBT/DLA 30/70+0,2%  $\text{TiO}_2$ .

FIG. 1. Radiation yield of hydrogen emission: (A) - PBT/DLA 30/70, (B) - PBT/DLA 30/70+0,2%  $\text{SiO}_2$ , (C) - PBT/DLA 30/70+0,2%  $\text{TiO}_2$ .





RYS. 2. Wydajność radiacyjna tlenu: (A) - PBT/DLA 30/70, (B) - PBT/DLA 30/70+0,2%SiO<sub>2</sub>, (C) - PBT/DLA 30/70+0,2% TiO<sub>2</sub>.  
 FIG. 2. Radiation yield of oxygen uptake: (A) - PBT/DLA 30/70, (B) - PBT/DLA 30/70+0,2% SiO<sub>2</sub>, (C) - PBT/DLA 30/70+0,2% TiO<sub>2</sub>.

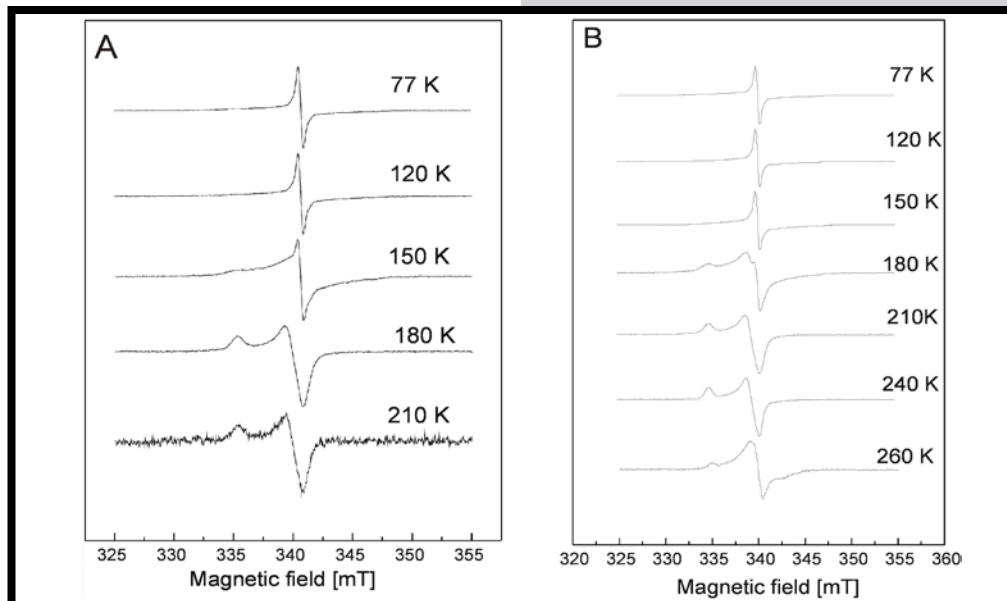
100kGy (B), PED modyfikowanego dodatkowo SiO<sub>2</sub> 100kGy (C) i PED+TiO<sub>2</sub> (D) ilustruje RYS. 4. Wyniki porównano z elastomerem silikonowym (E), który jest stosowany w medycynie na implanty piersi. Materiał silikonowy przed badaniem został wysterylizowany metodą radiacyjną dawką 25kGy. Jak wynika z RYS. 4, kopolimery PED 100 kGy (B) i PED z SiO<sub>2</sub> 100kGy (C) cechuje wzrost wytrzymałości na rozciąganie w stosunku do materiału wyjściowego PED (A), co potwierdza korzystną ich modyfikację. Materiał z SiO<sub>2</sub> (C) ma właściwości zbliżone do elastomeru silikonowego o jakości medycznej (E), co pozwala sądzić, że może być jego doskonałym zamiennikiem. Polimer PED+TiO<sub>2</sub> 100kGy (D) ma wytrzymałość na rozciąganie dużo mniejszą od materiału wyjściowego PED (A), co można wiązać ze stwierdzoną wcześniej wysoką abstrakcją tlenu.

The signal is observed even at 150K thus it can not be attributed to unstable ionic radicals that decay usually at lower temperatures. Thus, formation of interchain bonding system proceeds either just during irradiation or is related to the post-effects of the radicals formation as observed by EPR. The spectrum recorded at 180K shows characteristic features of peroxy radical signal what indicates that oxidation is a competitive pathway of radical processes. The increasing temperature causes decay of peroxy radical, what is a consequence of higher chain motility during the glass transition of copolymers [6].

The results of mechanical testing of PED copolymer (A), PED irradiated with 100kGy dose (B), PED modified with SiO<sub>2</sub> (C) and PED modified with TiO<sub>2</sub> (D) are collected in FIG. 4. The results are compared to silicone elastomer (E) used in medicine for shells of breast implants. Silicone elastomer was exposed to sterilizing radiation dose, i.e. 25kGy. As can be seen from FIG. 4, PED modified with 100 kGy (B) and polymer containing SiO<sub>2</sub> (C) showed increase of tensile strength as compared to the neat material (A) and modified with TiO<sub>2</sub> (B). Moreover, polymer modified with SiO<sub>2</sub> (C) compares very well with medical grade silicone elastomer indicating its great potential as silicone substitute. Polymer modified with TiO<sub>2</sub> (B) showed lower values of mechanical properties what can be explained by detected significantly high oxygen consumption.

## Conclusions

Poly(aliphatic/aromatic-ester) (PED) thermoplastic elastomers were modified with the use of two different approaches: (I) by e-beam radiation and (II) with the use of nanoparticles introduced in situ polymerization. Simultaneous application of methods I and II for material containing SiO<sub>2</sub> revealed in excellent mechanical properties comparable to medical grade silicone elastomer. However, due to relatively high oxygen consumption as revealed from EPR, it is recommended to use antioxidant to stabilize material structure.



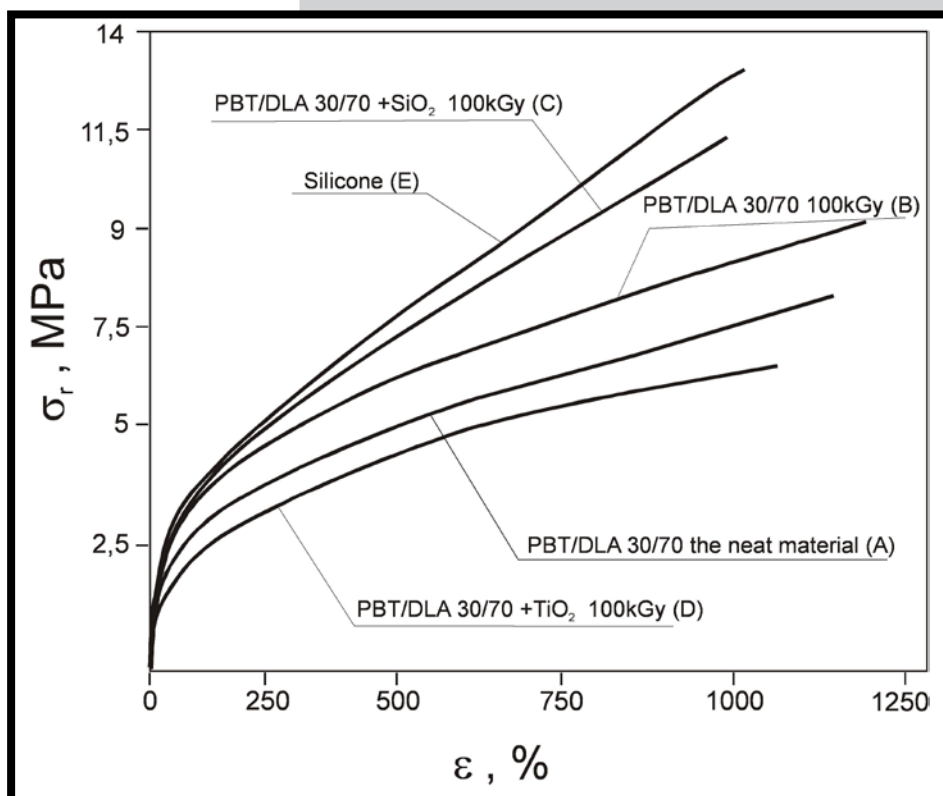
RYS. 3. Widma EPR kopolimerów PBT-DLA 30/70 (RYS.3A), PBT-DLA 30/70+SiO<sub>2</sub> (RYS.3B) napromieniowanych dawką 6kGy w warunkach kriogenicznych.  
 FIG. 3. EPR spectra of PBT-DLA 30/70 (FIG.3A), PBT-DLA 30/70+SiO<sub>2</sub> (FIG.3B) irradiated with a dose of 6kGy under cryogenic conditions.

## Podsumowanie

Poli(alifatyczno/aromatyczne-estry)(PED) z grupy elastomerów termoplastycznych poddano modyfikacji z zastosowaniem dwóch metod: (I) napromienianiem wiązką szybkich elektronów i (II) wprowadzając nanocząstki do struktury polimeru metodą polikondensacji in situ. Jednoczesne zastosowanie obydwu metod w odniesieniu do materiału zawierającego  $\text{SiO}_2$  pozwoliło otrzymać materiał o doskonałych właściwościach mechanicznych porównywalnych z elastomerem silikonowym o jakości medycznej. Jednakże, w związku ze stwierdzoną za pomocą metody EPR dosyć wysoką konsumpcją tlenu, zaleca się aby w odniesieniu do tych materiałów stosować dodatkowo antyutleniacze.

## Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego DWM/18/POL/2005.



RYS. 4. Krzywe naprężenie-wydłużenie dla kopolimerów PBT/DLA 30/70 materiał wyjściowy (A), PBT/DLA 30/70 100 kGy (B), PBT/DLA 30/70+ $\text{SiO}_2$  100 kGy (C), PBT/DLA 30/70+ $\text{TiO}_2$  100 kGy (D), silikon (E).

FIG. 4. Stress-strain curves for the neat PBT/DLA 30/70 material (A), PBT/DLA 30/70 100 kGy (B), PBT/DLA 30/70+ $\text{SiO}_2$  100 kGy (C), PBT/DLA 30/70+ $\text{TiO}_2$  100 kGy (D), silicone elastomer (E).

## Acknowledgements

This work has been financed from the research project DWM/18/POL/2005.

## Piśmiennictwo

- [1] Chen X.: J. Mater. Sci. Lett. 2002, 21, 1637-1639.
- [2] Fenglan X., Yubao L., Xuejiang W: J. Mater. Sci., 2004, 39, 5669-5672.
- [3] El Fray M., Slonecki J.: Polimery, 1996, 41, 214.
- [4] El Fray M., Bartkowiak A., Prowans P., Slonecki J.: Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000, 11, 757.

## References

- [5] Kornacka E., Kozakiewicz J., Legocka I., Przybylski J., Przybytniak G., Sadło J.: Polymer Degradation and Stability, 2006, 91, 2182.
- [6] Przybytniak G, Kornacka E, Ryszkowska J. Bil M, Rafalski A, Woźniak P, Lewandowska-Szumiel M. Nukleonika 2006, 51, 121.

# ENDOTHELIAL CELLS ON PET VASCULAR PROSTHESES IMPREGNATED WITH POLYESTER-BASED COPOLYMERS AND COATED WITH CELL-ADHESIVE PROTEIN ASSEMBLIES

JAROSLAV CHLUPAC<sup>1,2,3\*</sup>, ELENA FILOVA<sup>1,2</sup>, TOMAS RIEDEL<sup>4</sup>,  
EDUARD BRYNDA<sup>4</sup>, ELZBIETA PAMULA<sup>5</sup>, VERA LISA<sup>1</sup>,  
LUCIE BACAKOVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CELL POPULATIONS, INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, V.V.I., 1083 VIDENSKA ST., 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup> CENTRE FOR EXPERIMENTAL CARDIOVASCULAR RESEARCH, VIDENSKA ST. 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>3</sup> TRANSPLANT SURGERY CLINIC, INSTITUTE FOR CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, 1958/9 VIDENSKA ST., 140 21 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>4</sup> INSTITUTE OF MACROMOLECULAR CHEMISTRY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, V.V.I., 2 HEYEROVSKY SQ., 162 06 PRAGUE-6 PETRINY, CZECH REPUBLIC

<sup>5</sup> DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

\* E-MAIL: CHLUPAC@BIOMED.CAS.CZ

**Keywords:** vascular prosthesis, polyethylene terephthalate, poly(glycolide-L-lactide), poly(glycolide-L-lactide-ε-caprolactone), extracellular matrix, surface modification, collagen, laminin, fibronectin, fibrin, endothelial cells, static cell culture

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 108-111]

## Introduction

Artificial vascular prostheses have been used in vascular surgery since the early 1950s with the aim to replace large- and medium-caliber arteries [1]. A widely-used clinically-implanted textile graft material is polyethylene terephthalate (PET, Dacron), used in a knitted form [2]. An old technique for making the vascular graft impervious involved preclotting the graft with the patient's blood. This is now being superseded by impregnating the graft with natural polymers, such as collagen or gelatin, thus reducing the perioperative time and blood loss [3]. Graft patency is negatively influenced by the greater thrombogenicity and intimal hyperplasia developing on the synthetic material in comparison with less available autogenous natural bypass material [4]. This may be prevented by several graft surface modifications [5], including endothelial cell seeding [6]. Cell adhesion can be enhanced by extracellular matrix (ECM) protein deposition [7]. A vascular prosthesis with implemented biological components, such as adhering endothelial cells, may resemble a physiological vessel, improve clinical graft performance [8] and even enable small-caliber arteries to be replaced [9].

## Aim of the study

The aim of the study was to develop a technique for impregnating a clinically used PET vascular prosthesis with copolymer poly(glycolide-L-lactide) (PGL) or terpolymer poly(glycolide-L-lactide-ε-caprolactone) (PGLCap), followed by coating with cell-adhesive protein assemblies. Adhesion and growth of bovine endothelial cells on the modified prostheses was assessed in a static tissue culture experiment. Assemblies composed of a collagen type I (Co) coating with attached laminin (LM) and fibronectin (FN) were prepared to mimic the extracellular matrix (ECM). Collagen coated with a fibrin network (Fb) and FN mimicked an assembly providing a temporary scaffold for cells repairing injured vessels.

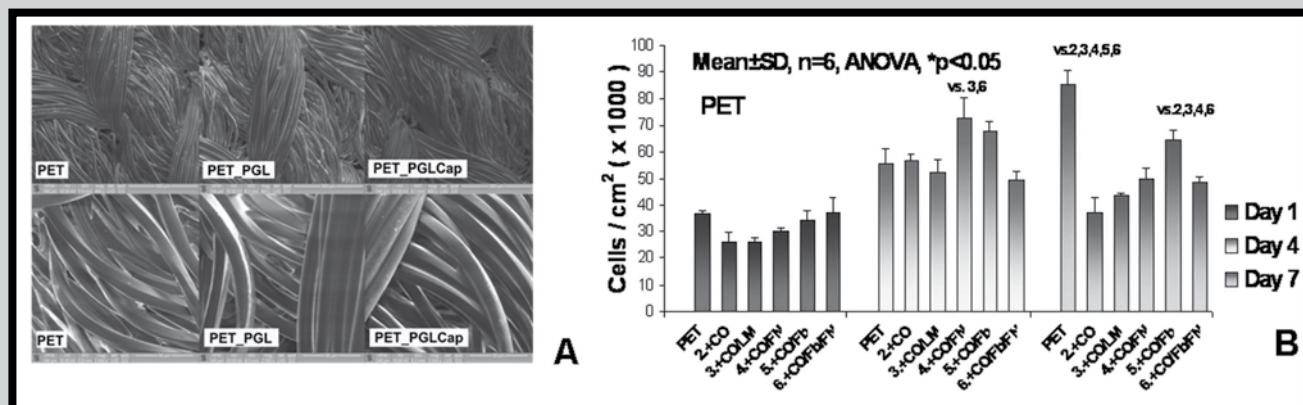
## Materials and methods

### Impregnating the prosthesis with polymers

A copolymer of glycolide and L-lactide (PGL), with a molar ratio of glycolide to L-lactide 15:85 (molecular masses: Mn=80kDa, Mw=152kDa), and a terpolymer of glycolide, L-lactide, and ε-caprolactone (PGLCap), with a molar ratio of glycolide to L-lactide to ε-caprolactone 10:70:20 (molecular masses: Mn=70kDa, Mw = 147 kDa) were synthesized at the Centre of Polymer and Carbon Materials (Polish Academy of Sciences, Zabrze, Poland), according to the method described previously [14-15]. PGL and PGLCap were dissolved in methylene chloride (POCh, Gliwice, Poland) in a concentration of 5% (w/v). A tubular polyethylene terephthalate (PET) vascular prosthesis (VUP, Joint-Stock Comp., Brno, Czech Republic) was cut up into a planar sheet and disc samples 1.6cm in diameter were cut out, placed into glass Petri dishes and 150μL of PGL or PGLCap solution was poured on to the luminal surface of each sample. Then the materials were air-dried overnight,

## Abstract

Arterial bypass surgery with synthetic vascular prostheses achieves poor patency rates compared to autogenous natural materials, and this is a challenge for tissue engineering research concerning small caliber vascular grafts. Modifications of the prosthetic surface followed by endothelial cell seeding may reduce thrombogenicity and intimal hyperplasia. Planar polyethylene terephthalate (PET) vascular prosthetic samples were impregnated with the copolymer poly(glycolide-L-lactide) (PGL) or with the terpolymer poly(glycolide-L-lactide-ε-caprolactone) (PGLCap) in order to lower the permeability of the knitted fabrics and ensure a less adhesive background. Subsequent modification with adhesive protein assemblies composed of collagen type I (Co) in conjunction with laminin (LM), fibronectin (FN) or fibrin (Fb) gel was performed to enhance cell adhesion. Bovine pulmonary artery endothelial cells (EC) of the CPAE line were seeded on to the coatings and subjected to static tissue culture conditions for 7 days. Impregnation of the PET prostheses decreased the initial adhesion and proliferation of the EC. After coating with the protein assemblies, the impregnated PET provided better substrates for cell culture than the protein-coated PET, on which the EC population started decreasing after 4 days of culture. The cells proliferated better on the CoFN, CoFb and CoFbFN coatings than on the Co and CoLM coatings. Impregnation type and adhesive matrix protein deposition may play an important role in successful endothelialization, healing and clinical performance of vascular grafts.



**FIG. 1. A.** Scanning electron microscopy of pure PET and PGL- and PGLCap-impregnated PET (NOVA nanoSEM 200, FEI, USA). Bar=300µm (upper picture series) and 50µm (lower series).

**B.** Endothelial cell densities on PET vascular prostheses modified with cell-adhesive protein multilayers.

followed by vacuum drying for the next 72h. The microstructure of the prostheses was studied with the use of a scanning electron microscope (Nova NanoSEM 200, FEI, USA), accelerating voltage 5 or 10kV, magnifications: 400x, 2000x and 8000x, vacuum 60 Pa. On this sample, there was no coating with a conductive layer (FIG. 1 A).

#### Modification with protein assemblies

The control PET samples and the PGL- or PGLCap-impregnated samples were coated with 143µl of collagen type I (rat tail, Bioscience) solution in 0.02 M acetic acid (75µg/ml), exposed to ammonia vapors for 5 min, rinsed with water and then with phosphate buffered saline (PBS). Fibronectin (human plasma, Roche) and laminin (Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane, Sigma) were attached to the collagen-coated surface by 3-hour-incubation with FN and LM solutions in PBS at concentrations of 50 µg/ml and 40 µg/ml, respectively. The surface-attached fibrin gel was prepared by rinsing the collagen coated samples with Tris buffer (TB) followed by rinsing successively with solutions of fibrinogen (Fbg, human plasma, Sigma, 50 µg/ml TB) for 60min, TB, Thrombin (Thr, human plasma, Sigma, 2.5 NIH U/ml) for 10 min, TB, Fbg (200µg/ml) containing antithrombin III (AT III 0.5 U/ml) for 2h, TB and PBS. A fibrin network was formed on the surface by catalytic action of the surface-attached thrombin on the ambient Fbg solution. Fibronectin was attached to the Fb network by incubating the sample with FN solution (50µg/ml) in PBS overnight. The composition of the samples prepared for the cell culture experiments is described in TABLE 1.

**TABLE 1. Samples prepared for cell culture experiments. PET: polyethylene terephthalate vascular prosthesis, PGL: poly(L-lactide-glycolide), PGL-Cap: poly(L-lactide-glycolide-(ε)-caprolactone), Co: collagen type I, LM: laminin, FN: fibronectin, Fb: fibrin gel. SEM micrographs of some of the samples are shown in FIG. 1 A.**

	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Control	PET	+Co	+CoLM	+CoFN	+CoFb	+CoFbFN
1 <sup>st</sup> set	PET-PGL	+Co	+CoLM	+CoFN	+CoFb	+CoFbFN
2 <sup>nd</sup> set	PET-PGLCap	+Co	+CoLM	+CoFN	+CoFb	+CoFbFN

#### Cell culture

The samples were sterilized by UV light irradiation for 30min, inserted into tissue culture plastic 24-well-plates (TPP, Switzerland) and seeded with endothelial cells (EC) of passage 20.-22., derived from bovine pulmonary artery (line CPAE ATCC CCL-209, Rockville, MA, USA) at a density of  $50 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. They were cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 7 days, and each sample was incubated in 1.5mL of Minimum Essential Eagle Medium (MEM) supplemented with 2mM L-glutamin, Earle's BSS with 1.5g/L sodium bicarbonate, 0.1mM non-essential amino acids, 1.0 mM sodium pyruvate (all chemicals from Sigma, USA.) and 20% of fetal bovine serum (FBS). 200 IU/ml of aprotinin (Carl Roth, Germany) were added to the medium on Fb-containing assemblies to inhibit EC fibrinolytic activity. On culture days 1, 4 and 7, the samples were washed with PBS and the cells were detached from the support using 400µL of the trypsin-EDTA solution (Sigma, USA) working for 15 min at 37°C. After neutralization with 800µL of MEM + 20% FBS, the suspended cells were counted using an automatic cell counter (Vi-CELL XR 2.03, Beckman Coulter, Inc., Miami, FL, USA) and the corresponding cell densities were plotted against culture time. Some of the samples were fixed with 80% methanol for 10 min, washed in PBS and stained overnight with a combination of Texas Red C2-maleimide (10ng/ml, Invitrogen) and Hoechst 33342 (5µg/ml, Sigma) fluorescence dyes to visualize the membrane and cytoplasmic proteins and the cell nuclei, respectively. Pictures were taken using the Leica 2500 confocal microscope at magnification 40x and zoom 2x.

#### Statistical analysis

The quantitative data is presented as mean ± SEM (Standard Error of Mean) expressing the number of independent experiments, or as mean ± SD (Standard Deviation) expressing the number of observation repetitions within one experiment. Statistical analyses were performed using either the unpaired Student's t-test or one way ANOVA analysis (Student-Newman-Keuls test) for multiple comparison performed with SigmaStat software (Jandel Corp., USA). The value  $p < 0.05$  was considered significant.

#### Results

##### Comparison of protein assemblies

The endothelium cultured on pure PET reached a significantly higher density than the endothelium on PET coated with protein assemblies on day 7 (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

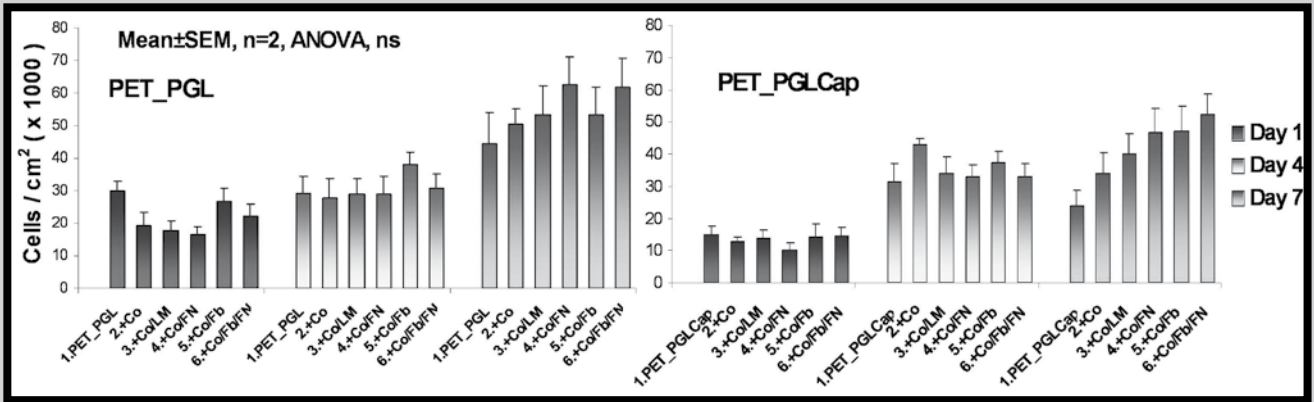


FIG. 2. Endothelial cell densities on PGL– and PGLCap–impregnated PET vascular prostheses modified with cell–adhesive protein multilayers.

The highest cell density was reached on CoFb (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (FIG. 1B). A decrease in cell density was observed between day 4 and day 7 on all PET samples coated with protein assemblies. Bad adhesion between PET and the nether collagen layer may have resulted in the protein coatings breaking away together with the adhering cells. The endothelial cells formed a confluent monolayer after 7 days of culture and reached the highest densities on CoFN, CoFb and CoFbFN surfaces prepared on both PGL– and PGLCap–impregnated PET samples. However, the difference between these coatings and the others was not statistically significant. There was also no statistical difference in adhesion and proliferation among the samples with different protein coatings on day 1 and day 4 (FIG. 2).

Comparison of the impregnation type and pure PET

EC showed better initial adhesion and proliferation (day 1 and day 4) on pure PET than on the PET–PGL and PET–PGLCap impregnated surfaces regardless of the additional protein coating, suggesting that the polymers form a more anti–adhesive background. Cell attachment and growth was better on PET–PGL than on PET–PGLCap, though the difference was not significant. The cell densities on polymer–impregnated PET were significantly lower on Co, CoFN, and CoFb (Student’s t–test,  $p < 0.05$ ) compared to PET on day 4. However, they reached similar final values on all protein–coated prostheses on day 7 (FIG. 3). In addition, the EC on the polymer–impregnated PET coated with CoFN, CoFb and CoFbFN formed a confluent monolayer with a cobblestone–like appearance, whereas the cells on the protein–uncoated PGL– and PGLCap–impregnated samples were spindle–shaped, oriented along the fibers in the PET fabrics and distributed more sparsely (FIG. 4).

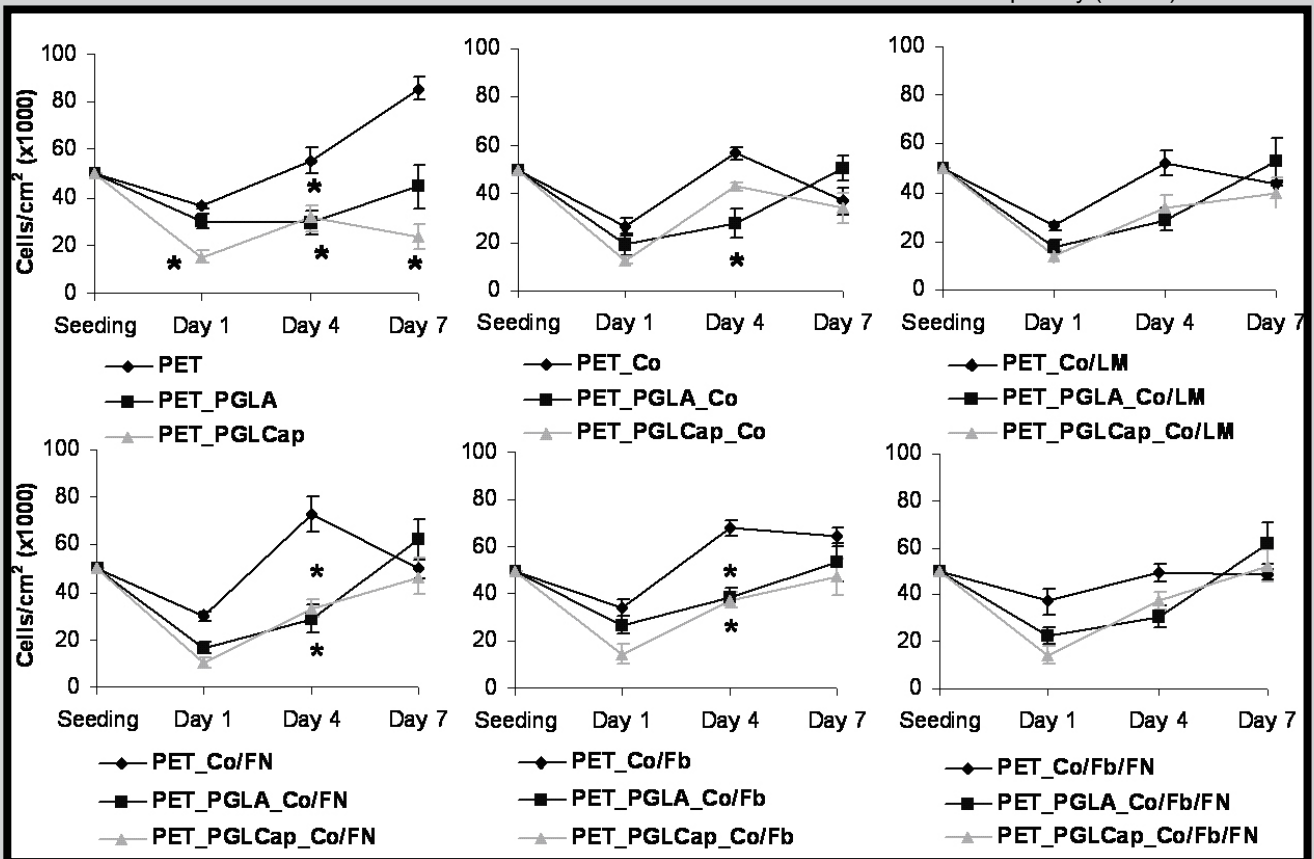
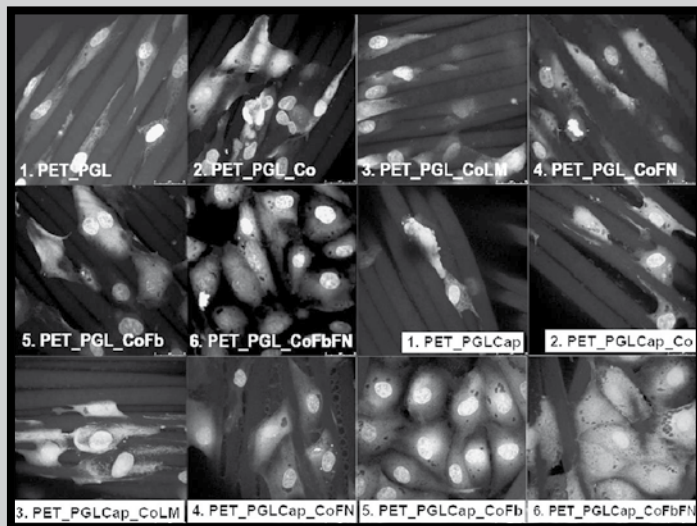


FIG. 3. Comparison of growth curves of endothelial cells on PET, PGL– and PGLCap–impregnated PET vascular prostheses with the same protein assembly coating. Student t–test,  $*p < 0.05$ .



**FIG. 4.** Bovine endothelial cells seeded on PGL- and PGLCap-impregnated PET vascular prostheses modified with cell-adhesive protein multilayers. Day 7 after seeding, stained with Texas Red C2-maleimide (red fluorescence) and Hoechst 33342 (blue fluorescence). Leica 2500 confocal microscope, magnification 40x, zoom 2x, bar=25 $\mu$ m.

## Discussion

It is well known that vascular prosthesis failure after human bypass surgery is caused mainly by artificial surface thrombogenicity and pseudointimal formation [10], the former being partially attributable to lack of a mature endothelium [11], and the latter to a mechanical compliance mismatch [12]. The present study was performed to evaluate endothelial cell colonization of biomimetic surfaces that may in a certain manner mimic the extracellular matrix in tissue engineering applications [13], and can be immobilized on samples of a clinically used vascular prosthesis. In addition, vascular prostheses were experimentally impregnated with relatively novel biodegradable polymers [14], [15]. Understanding the interaction of bioactive graft components with cells, tissue ingrowth and neovascularization [16] may play a major role in future improvement of the clinical performance of vascular prostheses [17].

## Conclusion

Polyester-based copolymer impregnation of PET prostheses decreased initial adhesion and proliferation of bovine endothelial cells. Cell growth was slightly better on PGL-impregnated PET than on PGLCap-impregnated PET. After coating with cell-adhesive protein assemblies the impregnated PET provided better substrates for cell culture than the protein-coated PET. The cells proliferated better on CoFN, CoFb and CoFbFN assemblies than on Co and CoLM assemblies.

## Acknowledgements

*The authors thank Mrs. Ivana Zajanova for her excellent technical assistance in immunocytochemistry and Dr. Helena Valentova for her help with confocal microscopy (both from Inst. Physiol., Prague, Acad. Sci CR, v.v.i.). We also thank Dr. P. Dobrzynski (PAN, Zabrze, Poland) for providing polymer samples and B. Trybalska, (AGH-UST, Krakow, Poland) for SEM studies. Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.*

*Funding: Centre for Experimental Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic, Grant Agency of the Acad. Sci. CR (grants No: 1QS500110564 and IAA400500507); Polish Ministry of Science (grant No: 3T08D01928).*

## References

- [1] Kannan, R. Y., et al., Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 2005, 74B(1): p. 570-581.
- [2] Xue, L. and H. P. Greisler, Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery*, 2003, 37(2): p. 472-480.
- [3] Chakfé, N., et al., Impregnated Polyester Arterial Prostheses: Performance and Prospects. *Annals of Vascular Surgery*, 1999, 13(5): p. 509-523.
- [4] Stegemann, J. P., H. Hong, and R. M. Nerem, Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *Journal of Applied Physiology*, 2005, 98(6): p. 2321-2327.
- [5] Bacakova L., et al., Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological Research*, 2004, 53 (Suppl 1): p. 35-45.
- [6] Bordenave, L., et al., In vitro endothelialized ePTFE prostheses: Clinical update 20 years after the first realization. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2005, 33(3): p. 227-234.
- [7] Joana, V., et al., Regulation of cell adhesion. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2005, 33(3): p. 167-188.
- [8] Meinhart, J. G., et al., Clinical autologous in vitro endothelialization of 153 infrainguinal ePTFE grafts. *Annual Thoracic Surgery*, 2001, 71(90050): p. S327-331.
- [9] Wang, X., et al., Development of Small-Diameter Vascular Grafts. *World Journal of Surgery*, 2007, 31(4): p. 682-689.
- [10] Muto, A., et al., Smooth muscle cell signal transduction: Implications of vascular biology for vascular surgeons. *Journal of Vascular Surgery*, 2007, 45(6, Supplement 1): p. A15-A24.
- [11] Vara, D.S., et al., Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(10): p. 599-612.
- [12] Tiwari, A., et al., Improving the patency of vascular bypass grafts: the role of suture materials and surgical techniques on reducing anastomotic compliance mismatch. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 2003, 25(4): p. 287-95.
- [13] Brynda, E., et al., Surface Immobilized Protein Multilayers for Cell Seeding. *Langmuir*, 2005, 21(17): p. 7877-7883.
- [14] Pamula, E., et al., Hydrolytic degradation of porous scaffolds for tissue engineering from terpolymer of L-lactide, [epsilon]-caprolactone and glycolide. *Journal of Molecular Structure*, 2005, 744-747: p. 557-562.
- [15] Dobrzynski, P., et al., Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(Acac)<sub>4</sub>. *Macromolecules*, 2001, 34(15): p. 5090-5098.
- [16] Zilla, P., D. Bezuidenhout, and P. Human, Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*, 2007, 28(34): p. 5009-27.
- [17] Nerem, R.M. and A.E. Ensley, The tissue engineering of blood vessels and the heart. *American Journal of Transplantation*, 2004, 4 Suppl 6: p. 36-42.

## LIMITING FIBER EXTENSIBILITY MODEL FOR ARTERIAL WALL

LUKAS HORNY<sup>1\*</sup>, RUDOLF ZITNY<sup>2</sup>, HYNEK CHLUP<sup>1</sup>, SVATAVA KONVICKOVA<sup>1</sup>,

CTU IN PRAGUE, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,  
4 TECHNICKA STR., 166 07 PRAGUE CZECH REPUBLIC

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF MECHANICS, BIOMECHANICS AND MECHATRONICS

<sup>2</sup>DEPARTMENT OF PROCESS ENGINEERING

\* E-MAIL: LUKAS.HORNY@FS.CVUT.CZ

Arterial walls exhibit anisotropic, nonlinear and inelastic response to external loads. Moreover arterial wall is non-homogenous material with complicated internal structure. These facts make the question about the best material model for arterial wall still unanswered. Nowadays approach to building constitutive models is characterized by incorporating structural information when considering e.g. layers, fibers, fiber orientation or waviness. The most frequent method how to incorporate structural information is to regard arterial wall as a fiber reinforced composite. Considerations about preferred directions are subsequently implemented into the framework of continuum mechanics.

Constitutive models are usually based on the theory of hyperelastic materials. Thus mechanical response of an arterial wall is supposed to be governed by a strain energy (or free energy) density function like in (1). The theory of hyperelastic materials is widely applied and studied in details in polymer science. Due to some phenomenological and structural similarities between rubber-like materials and biological tissues, methods of polymer physics are frequently applied in biomechanics, see Holzapfel [1]. Gent [2] suggested the new isotropic model for strain energy density function which was based on an assumption of limiting chain extensibility in polymer materials. The Gent model expresses strain energy  $y$  as a function of first invariant  $I_1$  of the right Cauchy-Green strain tensor as follows

$$y = -\frac{1}{2} m J_m \ln \left( 1 - \frac{I_1 - 3}{J_m} \right) \quad (1)$$

In equation (1)  $\mu$  denotes stress-like parameter, so-called infinitesimal shear modulus.  $J_m$  denotes limiting value of  $I_1 - 3$ . The domain of logarithm requires  $I_1 - 3 < J_m$ . Thus,  $J_m$  can be interpreted as limiting value for macromolecular chains stretch. Horgan and Saccomandi in [3] suggested its anisotropic extension. They recently published modification based on usual concept of anisotropy related to fiber reinforcement, see paper [4]. Horgan and Saccomandi use rational approximations to relate the strain energy expression to Cauchy stress representation formula. We adopted this term with small modification as follows

$$y = -m J_m \ln \left( 1 - \frac{(I_4 - 1)^2}{J_m^2} \right) \quad (2)$$

In (2)  $\mu$  denote shear modulus.  $J_m$  is the material parameter related to limiting extensibility of fibers. The similar definitional inequality like in (1) must be hold for logarithm in (2). Thus  $I_4$  must satisfy  $(I_4 - 1)^2 < J_m^2$ .  $I_4$  denotes so called fourth pseudo-invariant of the right Cauchy-Green strain tensor which arises from the existence of preferred direction in continuum.

It is worth to note that total number of invariants of the strain tensor is five in the case of transversely isotropic material and nine in the case of orthotropy. Details can be found in e.g. Holzapfel [5]. Model (2) presumes two preferred directions in continuum which are mechanically equivalent. Due to cylindrical shape of an artery we can imagine it as helices with same helix angle but with antisymmetric orientation. This is illustrated in the FIG. 1.

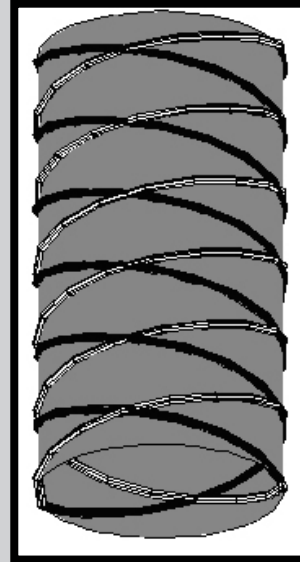


FIG. 1. Local orthotropy – the tube is reinforced by two families of mechanical equivalent fibers.

$I_4$  can be expressed in the form given in (3).

$$I_4 = l_r^2 \cos^2 \beta + l_z^2 \sin^2 \beta \quad (3)$$

Stretched configuration of the tube is characterized by  $\lambda_r$ , what denotes circumferential stretch and  $\lambda_z$  what denotes axial stretch, respectively. Model (2) contains three material parameters. Above described  $\mu$ ,  $J_m$  and  $\beta$ . The third material parameter  $\beta$  has the meaning of angle between fiber direction and circumferential axis. There are two families of fibers with angle  $\pm\beta$ , however,  $I_4$  is symmetric with respect to  $\pm\beta$ .

In order to verify capability of (2) to govern multi-axial mechanical response of an artery regression analysis based on previously published experimental

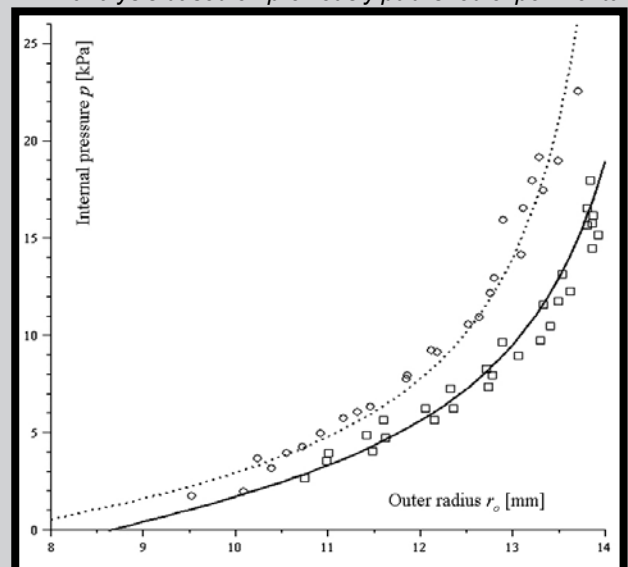


FIG. 2. Inflation test and model prediction: red/square –  $\lambda_z=1.3$ ; blue/circle –  $\lambda_z=1.42$ .

data was performed. Details of experimental method and specimen can be found in Horny et al. [6]. Briefly we resume basic facts. Male 54-year-old sample of thoracic aorta underwent inflation test under constant axial stretch. The tubular sample was 6 times pressurized in the range 0kPa–18kPa–0kPa under axial pre-stretch  $\lambda_z=1.3$  and 3 times in the pressure range 0kPa–20kPa–0kPa under  $\lambda_z=1.42$ , respectively. The opening angle was measured in order to account residual strains. Radial displacements were photographed and evaluated by image analysis.

Regression analysis based on least square method gave the estimations for material parameters  $\mu$ ,  $J_m$  and  $\beta$ . The vessel was modeled as thick-walled tube with residual strains. The material was supposed to be hyperelastic and incompressible. No shear strains were considered. Fitting of material model was based on comparison of model predicted and measured values of internal pressure. Results are illustrated in FIG. 2. We can conclude that proposed material model fits experimental data successfully. Thus strain energy given in (2) is suitable to govern arterial response during its inflation and extension. Estimated values of parameters for material model (2) are as follows:  $\mu = 26\text{kPa}$ ;  $J_m = 1.044$ ;  $\beta = 37.2^\circ$ .

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 112-113]

## Acknowledgements

This research has been supported by project of Czech Ministry of Education, Youth and Sport ID: MSM 68 40 77 00 12 and Czech Science Foundation project ID: GA CR 106/08/0557.

## References

- [1] Holzapfel GA (2005) Similarities between soft biological tissues and rubberlike materials, in: Austrell PE, Keri L (eds.), Constitutive models for rubber IV, AA Balkema Publishers, Leiden, Netherlands, 2005, pp 607–617.
- [2] Gent AN (1996) New constitutive relation for rubber. Rub. Chem. Technol., vol. 69, no. 1, pp. 59–61.
- [3] Horgan CO, Saccomandi G (2003) A description of arterial wall mechanics using limiting chain extensibility constitutive models. Biomechan. Model. Mechanobiol., vol. 1, no. 4, pp. 251–266.
- [4] Horgan CO, Saccomandi G (2005) A new constitutive theory for fiber-reinforced incompressible nonlinear elastic solids. J. Mech. Phys. Solids, vol. 53, no. 9, pp. 1985–2015.
- [5] Holzapfel GA (2000) Nonlinear solid mechanics – A continuum approach for engineering. Chichester: John Wiley & Sons, ch. 6.
- [6] Horny L, Zitny R, Chlup H, Mackova H (2006) Identification material parameters of an aortic wall. Bulletin. Appl. Mechan. Vol. 2, pp.173–182.

## AN ULTRASONIC METHOD FOR ESTIMATION OF ELASTIC PROPERTIES OF R-BONE CEMENT AFTER IMMERSION IN RINGER'S SOLUTION

IZABELLA RAJZER<sup>1,3\*</sup>, JAN PIEKARCZYK<sup>2</sup>, OSCAR CASTANO<sup>3</sup>, ELISABETH ENGEL<sup>3</sup>, JOSEF A. PLANELL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ATH-UNIVERSITY OF BIELSKO-BIALA, FACULTY OF MATERIALS AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, INSTITUTE OF TEXTILE ENGINEERING AND POLYMER SCIENCE, DEPARTMENT OF POLYMER MATERIALS, 2 WILLOWA STREET, 43-309 BIELSKO-BIALA, POLAND

<sup>2</sup>AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF ADVANCED CERAMICS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>3</sup>IBEC, INSTITUTE FOR BIOENGINEERING OF CATALONIA, 13 BALDIRI REIXAC, 08028 BARCELONA, SPAIN

\* E-MAIL: IPIEKARC@YAHOO.ES

## Abstract

The aim of this investigation is to establish an improved non-destructive ultrasonic through-transmission technique to monitor the setting behaviour of calcium phosphate cement samples.

On the basis of ultrasound techniques the elastic properties of cement paste after different soaking time in Ringer's solution were measured. Young's modulus, the rigidity modulus, and Poisson's ratio were calculated from measurements of density and ultrasonic longitudinal and shear wave velocities.

**Keywords:** calcium phosphate cement, elastic properties, injectability, ultrasonic method

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 113-116]

## Introduction

Calcium-phosphate based ceramics (such as hydroxyapatite) are promising materials for orthopedic and dental surgery. They closely resemble the mineral phase of the bone extracellular matrix, so they are expected to be osteoinductive and osteoconductive, promoting regeneration of the damaged bone tissue [1-2]. A calcium phosphate cement (CPC) was developed with the advantage of being moldable (the CPC paste intimately adapts to the bone cavity) and capable of in situ setting to form hydroxyapatite [3]. The ability of obtaining biologic apatite under physiologic conditions (in an aqueous environment at body temperature), opening a new strategy to traditional ceramic sintered at high temperatures, is one of the most important factors in the creation of a new class of bone substitute implants. Calcium phosphate cements generally consist of a powder and an aqueous liquid which are mixed to form a paste. The paste is placed into a defect as a substitute for the damaged part of the bone. Most conventional CPC are mixed with an aqueous solution immediately before application. In the clinical situation, the ability of the surgeon to properly mix the cement and then place the cement paste into the defect within the prescribed time is a crucial factor in achieving optimum results. Therefore, it is desirable



to develop injectable premixed CPC in which the paste is prepared in advance under well-controlled conditions [4-5]. The properties of cementitious materials are changing from a suspension to a solid during the setting process. Many different test methods are used today to characterize injectable cements and set cement materials for biomedical applications [6-8]. In the present project, we have applied the through-transmission technique to characterize the mechanical properties of injectable calcium phosphate cement, which were placed in Ringer's solution for different days. A strong advantage with the proposed technique is that it is non-invasive and non-destructive. The changes occurring in the cement samples after being soaked in the Ringer's solution can be systematically investigated (starting from initial paste to the final set cement).

## Materials and methods

The R cement was prepared as a mixture of two powders: CSPP (calcium potassium sodium phosphate;  $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ ) and MCPM (monocalcium phosphate monohydrate;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ). As a liquid phase we have used a mixture of glycerol and polyethylene glycol (PEG). Glycerol was selected as a liquid phase because it is nontoxic, biocompatible and is also water-miscible. When CPC-glycerol paste is immersed in water, there is a glycerol-water exchange, resulting in cement hardening [3]. Therefore this water-free paste should harden only when exposed to an aqueous environment. Polyethylene glycol was chosen because it improved the cohesion and the injectable properties of the paste [4].

The liquid phase (glycerol mixed with polyethylene glycol) and the R cement powder were mixed in a mortar to obtain a water-free paste with workable consistency, using a liquid/powder ratio of 0.46ml/g and then placed into the syringe. Then the paste was filled into a mold of 6mm in diameter and 12mm high and incubated in a Ringer's solution at 37°C. After 1,3,4,5,7,8,11,12 and 14 day's of immersion, the samples were quenched in acetone and dried to stop the reaction. On the basis of ultrasound techniques the elastic properties of cement paste (such as Young's modulus, the Poisson's ratio of the material and modulus of rigidity) after different soaking time in Ringer's solution were measured.

The ultrasonic measurements were performed using a through-transmission technique. One of the most important parameters for assessing the hardened state and other material parameters is the ultrasonic velocity, which can be derived from the travel time of the wave following transmission through the material. For velocity  $v$ , the well-known equation  $v=s/t$  applies in general with travel time  $t$  and travel path  $s$  (dimensions of material) [10]. The time of transmission depends on many variables, such as type of material, compactness, microstructure (iso- or anisotropy), elasticity constant values, pore size and shape, total porosity, pore distribution, density and geometry of material (dimensions).

We recorded the transmission time through an area of known thickness (samples dimensions) with both longitudinal wave and shear wave transducers, and then we used the following equation to calculate the Poisson's ratio ( $\mu$ ). If the density of material is known the modulus are also available.

$$\mu = \frac{V_L^2 - 2V_T^2}{2(V_L^2 - V_T^2)}$$

A longitudinal wave ( $V_L$ ) and a perpendicular wave ( $V_T$ ) propagates in a solid with a velocity:

$$V_L = \sqrt{\frac{E \cdot (1 - \mu)}{\rho \cdot (1 + \mu) \cdot (1 - 2\mu)}} \quad V_T = \sqrt{\frac{G}{\rho}}$$

where  $E$  is the Young's modulus,  $G$  modulus of rigidity,  $\rho$  the mass density.

Measurements of the propagation velocity of longitudinal ultrasonic vibrations were done using both the Polish equipment MT-541 (UNIPAN) at the frequency  $f=0.5\text{MHz}$  and to measure the propagation velocity of shear ultrasonic wave we used UZP1 (INCO-VERITAS) with probes for  $f=4\text{MHz}$ .

In these apparatus one head emits the ultrasonic wave while the other one is a receiver, collecting the wave after transmission through the materials (FIG. 1). The mean velocities were obtained by averaging the three independent measurements.

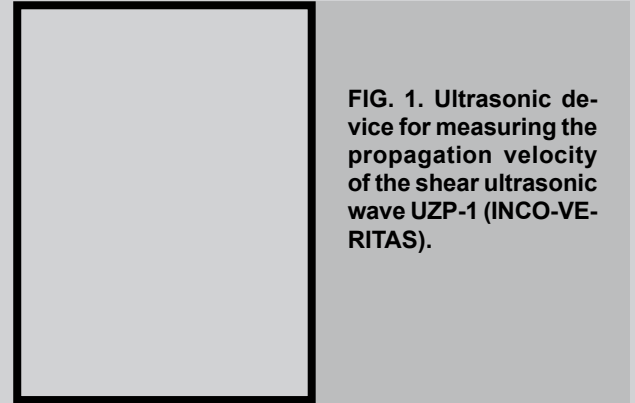


FIG. 1. Ultrasonic device for measuring the propagation velocity of the shear ultrasonic wave UZP-1 (INCO-VERITAS).

Measurements of the longitudinal waves velocity were made along the sample height and diameter. The shear wave velocity has been measured only along the diameter of the samples. The porosity of the cement samples were measured by a mercury intrusion technique. XRD was used to determine the crystalline phase after setting and to find out if a conversion to calcium deficient hydroxyapatite (CDHA) took place or if remains of a starting material were present. The XRD patterns were recorded with a powder X-ray diffractometer.

## Results

The apparent densities of the samples after different days of immersion in Ringer's solution were calculated (FIG. 2). The apparent density of R-cement materials was ranging between 1.40 and 1.07g/cm<sup>3</sup>. The highest values of the density (about 1.40g/cm<sup>3</sup>) were measured after one day of immersion in Ringer's solution.

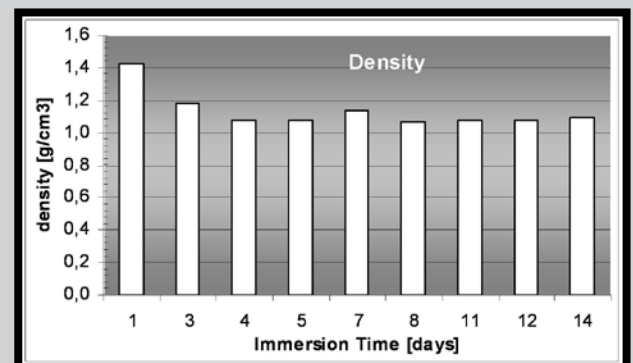


FIG. 2. Densities of the investigated R - cement materials after different soaking times in Ringer's solution.

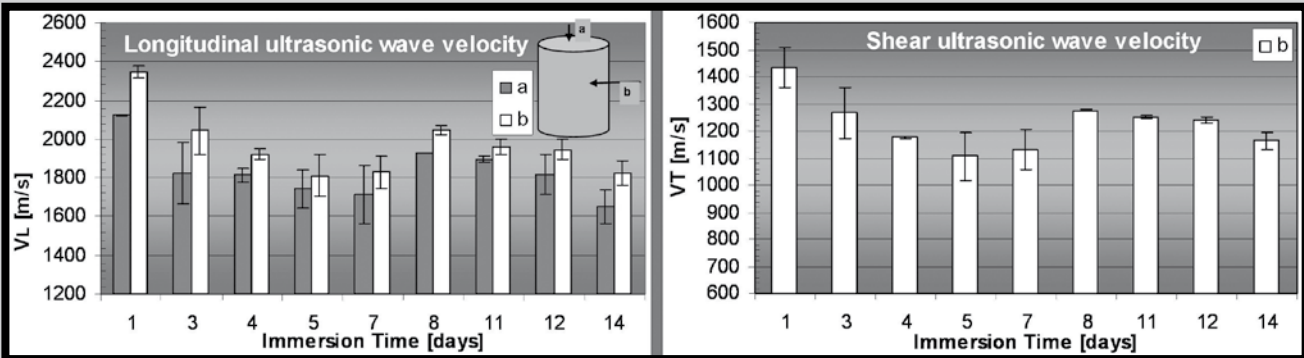
**TABLE 1. Anisotropy of the cement samples after different days of immersion in Ringer's solution.**

Immersion time [days]	Anisotropy [%]
1	10.1
3	12.9
4	5.3
5	3.3
7	6.3
8	6.2
11	3.5
12	8.2
14	13.4

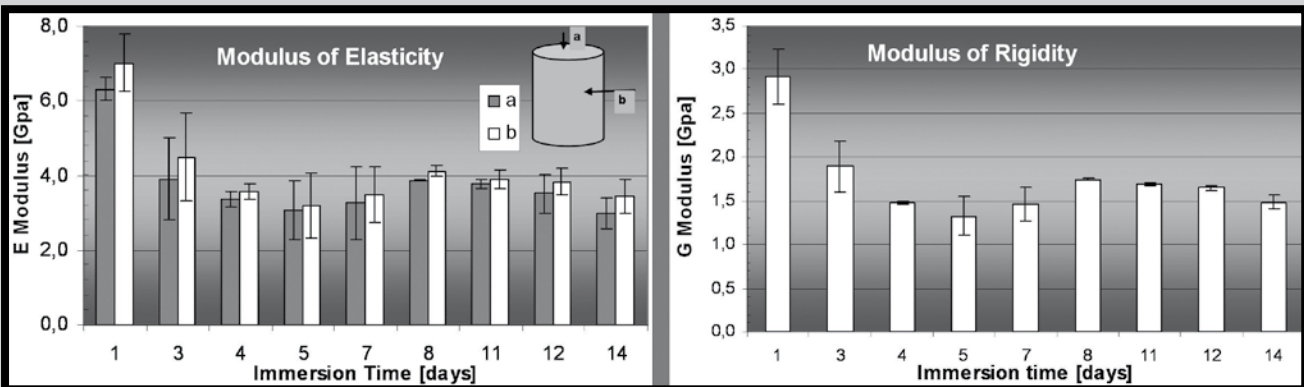
The anisotropy measurements were performed using MT-541 equipment at the frequency of  $f=0.5\text{MHz}$ . This anisotropy is defined as:  $A=V_L(a) / V_L(b)$ , where  $V_L(a)$  and  $V_L(b)$  are wave velocities along the sample length and diameter, respectively. A significant anisotropy of the wave velocity (about 13%) was found in the samples after 3 and 14 days of immersion in Ringer's solution (TABLE 1). After more than 3 days of soaking the samples become isotropic.

The highest values of longitudinal wave velocity were measured along the diameter of the cement cylinders. As seen in FIG. 3, the ultrasonic velocity decreases with the immersion time. The highest values of the wave velocity were observed in the first day of immersion. 7 days of soaking effectively decrease the ultrasonic wave propagation velocity in R-cement materials. We can observe a decrease of 19% after measurement made along the samples length (a) and 22% along the samples diameter (b). Further immersion (8 days) resulted in slight wave velocity increase and then the velocity slowly decreased after more days of immersion, probably due to the degradation process. The changes in the propagation velocity of the shear ultrasonic wave along the diameter of the cement cylinders are similar to the changes of longitudinal wave velocity.

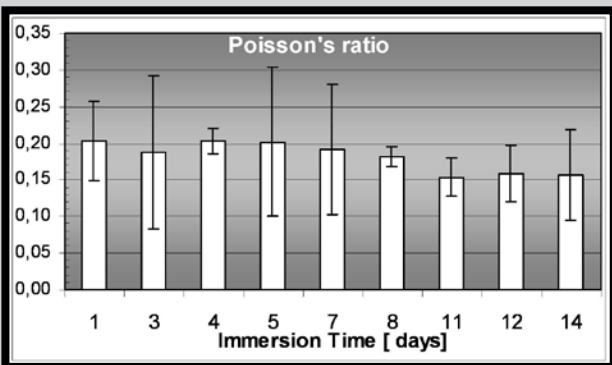
The material constants: Young's modulus (E) and modulus of rigidity (G) determined basing upon the ultrasonic investigations are presented in FIG. 4. The E and G values



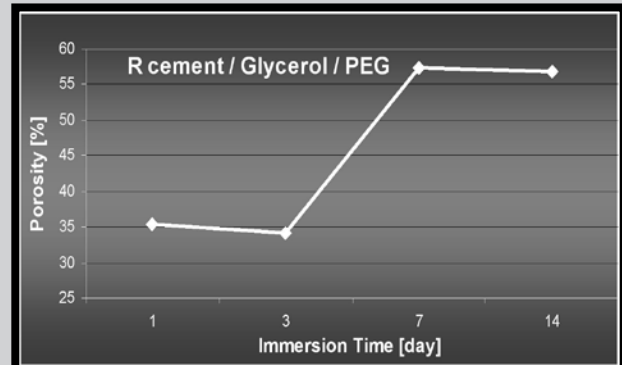
**FIG. 3. Longitudinal and transverse ultrasonic wave velocity (a) along the sample length; (b) along the sample diameter after different soaking times in Ringer's solution.**



**FIG. 4. Material constants: E, Young modulus; G, modulus of rigidity: (a) along the sample length; (b) along the sample diameter.**



**FIG. 5. Poisson's ratio of the investigated R-cement materials after different soaking times in Ringer's solution.**

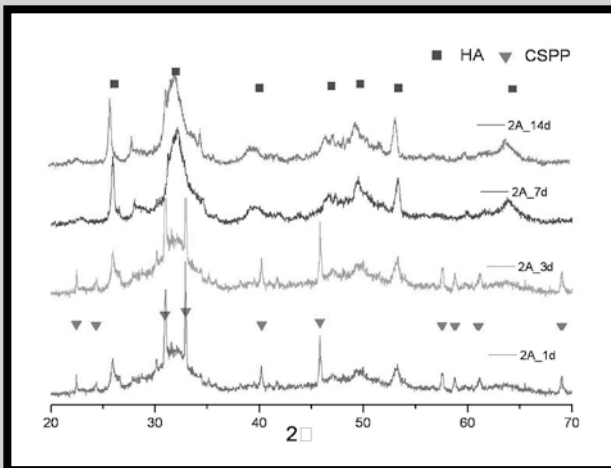


**FIG. 6. Porosity of the R cement/glycerol/PEG samples after different incubation times in Ringer's.**

obtained for the R-cement materials after 7 days of soaking in Ringer's solution were about 50% lower than at the beginning of the experiment. The cement materials after an immersion time of 14 days exhibit Young's modulus values of  $3.43 \pm 0.45$  GPa while their modulus of rigidity is  $1.48 \pm 0.08$  GPa. The changes in the E, G values are similar to those obtained for longitudinal and shear ultrasonic wave velocity. The changes in the Poisson's ratio do not provide any special information (FIG. 5) and its average value is about 0.2.

The porosity values versus immersion time in Ringer's solution is presented in figure 6. Porosity gradually increases due to the degradation when the samples are immersed in Ringer's solution. R-cement materials presented a total porosity of 55% after 7 days of immersion in Ringer's solution.

FIGURE 7 shows the patterns of X-ray diffraction of the sample R cement/glycerol/PEG after 1, 3, 7 and 14 days of immersion in Ringer's solution. After 1 day of immersion characteristic peaks of CSPP were present. After 7 days CSPP's peaks disappeared, meaning that the R cement had totally converted into calcium deficient hydroxyapatite (CDHA).



**FIG. 7. The X-ray diffraction spectrum of the R cement/glycerol/PEG samples after different times of immersion in Ringer's solution.**

## Discussions

The injection properties of R cement can be improved by substituting the liquid phase with glycerol. When the paste was immersed in Ringer's solution, there was a glycerol-to-water exchange, resulting in cement hardening. The cement setting is the result of a dissolution and precipitation process, and the entanglement of the precipitated crystals is responsible for cement hardening [11]. The set samples consisted of calcium deficient hydroxyapatite (CDHA), as determined by X-Ray diffraction, where no compositional change was produced by the polymer (PEG) addition. After seven days of immersion in Ringer's solution, R cements samples were totally converted to CDHA, therefore the elastic properties of the R-cement after these time of immersion started slowly to increase and than again to decrease due to the degradation process.

## Conclusions

The ultrasonic device presented in this article is able to extract certain parameters of ultrasonic waves recorded during the setting and hardening of R-cement paste materials. With improved sensitivity, the ultrasonic measurement is able to monitor processes inside the cement paste. It is practicable to measure elastic properties of the cement samples by using ultrasonic technique.

## Acknowledgements

*This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science, project "estancias de jóvenes doctores extranjeros en universidades publicas y centros de investigacion espanoles" 2007-2008.*

## References

- [1] E. Fernandez, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell "Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part II: Precipitate formation during setting reactions" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 (1999) 177 – 183.
- [2] G. Mestres, O. Castaño, M. Navarro, A. Almirall, E.S. Sanzana, M.P. Ginebra and J.A. Planell "A novel hybrid calcium phosphate/ACP injectable cement" 8th World Biomaterials Congress. Amsterdam, The Netherlands, 28 May – 1 June 2008.
- [3] Lisa E. Carey, Hockin H.K. Xu, Carl G. Simon Jr., Shozo Takagi, Laurence C. Chow "Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair" *Biomaterials* 26 (2005) 5002-5014.
- [4] H.H.K. Xu, L.E. Carey, C.G. Simon, S. Takagi, L.C. Chow "Premixed calcium phosphate cements: Synthesis, physical properties, and cell cytotoxicity" *Dental Materials* 23 (2007) 433-441.
- [5] H. Liu, H. Li, W. Cheng, Y. Yang, M. Zhu, C. Zhou "Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials" *Acta Biomaterialia* 2 (2006) 557-565.
- [6] J. Carlson, M. Nilsson, E. Fernandez, J.A. Planell "An ultrasonic pulse-echo technique for monitoring the setting of CaSO<sub>4</sub>-based bone cement" *Biomaterials* 24 (2003) 71-77.
- [7] M.P. Ginebra, J.A. Delgado, I. Harr, A. Almirall, S. Del Valle, J.A. Planell "Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 351-361.
- [8] M. Habib, G. Baroud, F. Gitzhofer, M. Böhner "Mechanisms underlying the limited injectability of hydraulic calcium phosphate paste" *Acta Biomaterialia* xxx (2008) xxx-xxx.
- [9] L. Leroux, Z. Hatim, M. Freche, J. L. Lacout "Effects of Various Adjuvants (Lactic Acid, Glycerol, and Chitosan) on the Injectability of a Calcium Phosphate Cement" *Bone* Vol. 25, No. 2, Supplement August 1999 : 31S-34S.
- [10] M.D. Vlad, R. Torres, J. Lopez, M. Barraco, J.A. Moreno, E. Fernandez "Does mixing affect the setting of injectable bone cement? An ultrasound study" *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 18 (2007) 347-352.
- [11] M.P. Ginebra, E. Fernandez, E.A.P. De Maeyerl, R.M.H. Verbeeckl, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C.M. Driessens, and J.A. Planell "Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement" *J Dent Res* 76(4): 905-912, April, 1997.

# THE ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURES ON CARBORANETHIOL-MODIFIED GOLD FILMS

MARTIN PARIZEK<sup>1\*</sup>, TOMAS BASE<sup>2</sup>, MICHAEL G.S. LONDESBOROUGH<sup>2</sup>, VERA LISA<sup>1</sup>, LUCIE BACAKOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD. SCI. CR, 1083 VIDENSKA STR., 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC

<sup>2</sup> INSTITUTE OF INORGANIC CHEMISTRY, ACAD. SCI. CR, 250 68 HUSINEC-REZ 101, CZECH REPUBLIC

\* E-MAIL: PARIZEK.M@SEZNAM.CZ

## Abstract

*Metal surfaces have become important over the last decade for potential surgical implants, and within this context we present here a study of the cell growth on modified gold surfaces. Gold films, deposited on glass plates and annealed with a hydrogen flame, were modified with four different carboranethiol derivatives: 1-(HS)-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub> (A), 1,2-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (B), 9,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (C) and 1,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (D). The materials engendered from these modifications were used to investigate the adhesion and growth of rat aortic smooth muscle cells cultured on these surfaces in a DMEM medium with 10% of fetal bovine serum. One day after seeding, the highest number of initially adhered cells was found on the surface of a bare gold film. However, three days after seeding, the number of cells on carboranethiol-modified gold samples B, C and D was significantly higher than the number on a bare gold film. After seven days, the number of cells on a bare gold film and on gold films modified with derivatives A, B and D was very similar, but the surface of a gold film modified with derivative C exhibited a significantly smaller number of cells. This may be explained by the exposure of the CH vertices of the carborane cluster, which are more acidic than the BH vertices exposed toward the cells in either A or B.*

**Keywords:** Metal coating, gold film, carboranethiol, cell adhesion, cell spreading, cell proliferation, biomaterials, tissue engineering, surgical implants.

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 117-119]

## Introduction

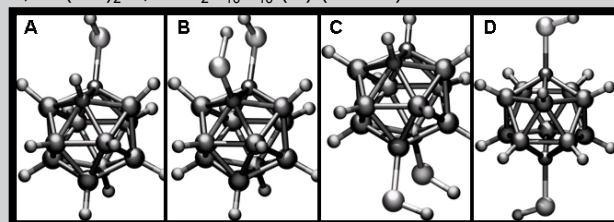
Artificial and nature-derived materials, including metals, have been intensively studied in medicine and in various biotechnologies. Examples are bio-imaging, bio-sensing, drug delivery, cell cultivation, and the construction of replacements of irreversibly damaged tissues and organs. A largely accepted concept in recent tissue engineering is of surfaces supporting and controlling cell colonization associated with successful integration of an implant within the organism. This concept is used for the construction of durable bone prostheses persisting in the patient for many years, and is being developed to make bio-artificial replacements of blood vessels, liver, pancreas or even nervous tissue (for a review, see [1-3]).

Metallic materials have frequently been utilized in a hard tissue surgery, e.g., for constructing joint prostheses and other bone implants. However, these materials could be used in the form of thin nanocomposite films in soft tissue surgery, e.g. for coating artificial heart valves or vascular prostheses. Gold, one of the metallic materials that have been studied, has been used in medicine and in implantology because of its inert character and negligible toxicity. Gold reacts easily with thiol (-SH) groups [4], and this reaction can be used for modifying gold films to make surfaces suitable for the adhesion and growth of cells. In this study, we present the use of flat gold coatings modified with selected carboranethiol derivatives as new substrates for cell colonization. Vascular smooth muscle cells were chosen as a model system because they are an important component of both hard and soft tissues and organs - including bone and blood vessels.

## Experimental

### Preparation of the gold samples

Gold films deposited on glass plates with dimensions 11×11mm were purchased from Arrandee (Germany). All films were freshly annealed with a hydrogen flame before use. These films were modified with carboranethiol derivatives in accordance with the literature [4]. The following carboranethiol species were used: 1-(HS)-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub> (A), 1,2-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (B), 9,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (C) and 1,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (D) (FIG. 1).

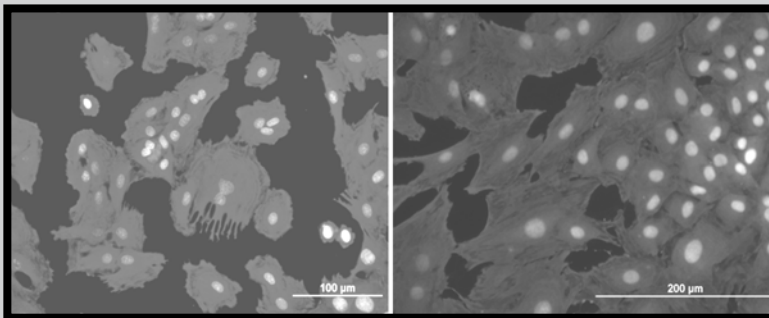


**FIG. 1. Carboranethiol derivatives used for modification of gold films: 1-(HS)-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub> (A), 1,2-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (B), 9,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (C) and 1,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (D).**

### Cells and culture conditions

For the cell culture experiments, the materials were sterilized with 70% ethanol for 1 hour, inserted into 24-well polystyrene plates (TPP, Switzerland; well diameter 1.5 cm), and seeded with smooth muscle cells derived from rat aorta by an explantation method [1,2]. The cells were used in passage 3 and seeded at a density of 17 000/cm<sup>2</sup>. The cells were cultivated for 1, 3 or 7 days in 1.5 ml Dulbecco's Modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma, U.S.A.), supplemented with 10% foetal bovine serum (Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) and 40 µg/ml of gentamycin (LEK, Ljubljana, Slovenia), in a cell incubator with a humidified atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> in the air and at a temperature of 37°C. For each experimental group and time interval, three samples were used.

The cells on one sample for each experimental group were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed by 70% cold ethanol (-20°C, 5 min) and stained with a combination of Texas Red C2-maleimide fluorescent membrane dye (Molecular Probes, Invitrogen, Cat. No. T6008; 20 ng/ml in PBS), and Hoechst # 33342 nuclear dye (Sigma, U.S.A.; 5µg/ml in PBS). The number and morphology of the cells on the sample surface were then evaluated from pictures (10 for each sample, size 0.136mm<sup>2</sup>) taken under an Olympus IX 50 microscope using an Olympus DP 70 digital camera (FIG. 2).



**FIG. 2.** Examples of the morphology of vascular smooth muscle cells on day one (left) and day 7 (right) after seeding on a gold film modified with the carboranethiol derivat 1-(HS)-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub> (A). Stained with Texas Red C2-maleimide and Hoechst #33342. Olympus IX microscope 50, obj. 20, digital camera DP 70.

On the remaining two samples, the cells were rinsed with PBS, released using a trypsin-EDTA solution (Sigma, Cat. No. T4174) and counted in a Cell Viability Analyzer (VI-Cell XR, Beckman Coulter). As control materials, samples with a bare gold film, standard tissue culture polystyrene dishes (PS) and uncoated glass substrates were used.

The size of the cell spreading areas, i.e., cell areas projected on the material surface, was measured one day after seeding using Atlas software (Tescan Ltd., Brno, CR). Fifty seven to 170 cells from 10 pictures for each experimental group were evaluated.

## Statistics

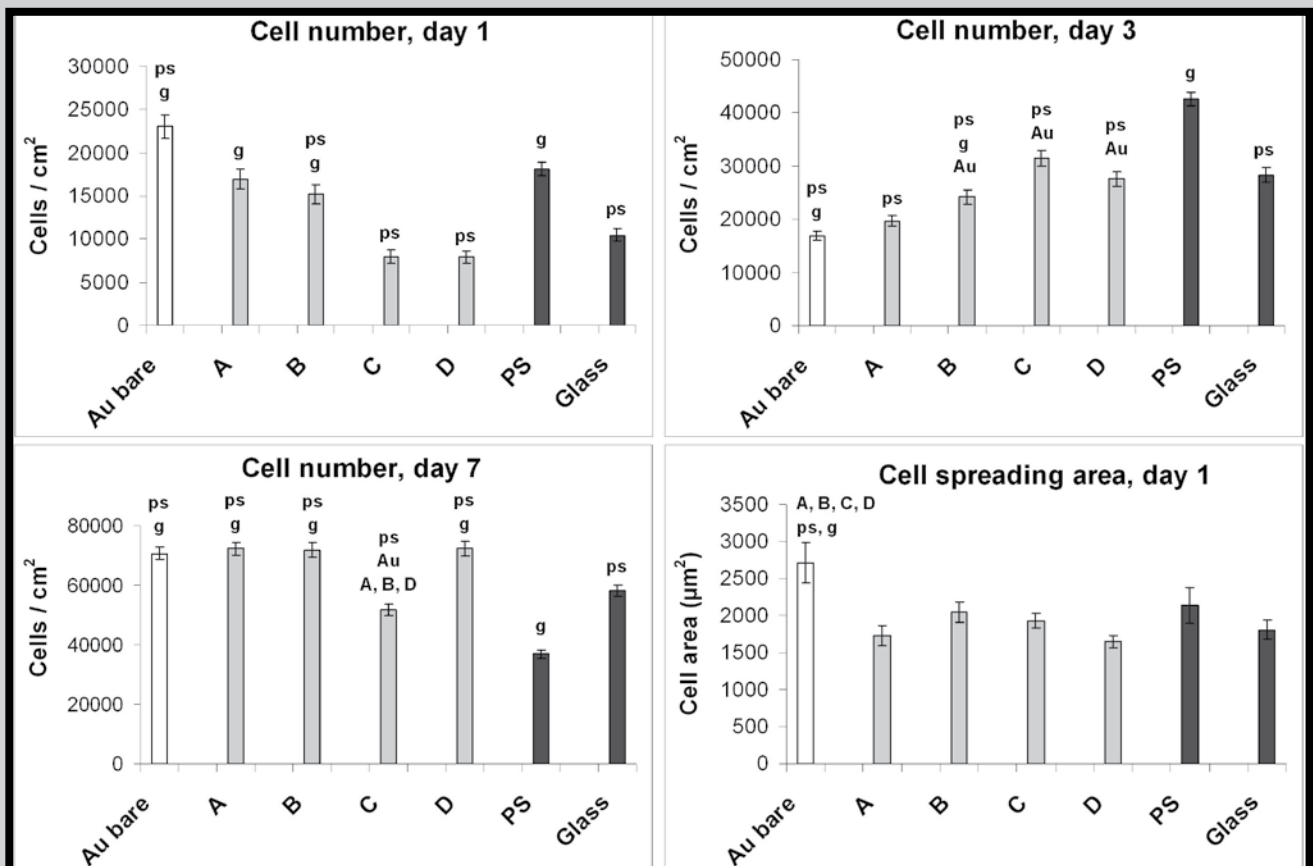
The results are presented as a mean value with a standard error (Mean  $\pm$  SEM). Statistical significance was evaluated using the ANOVA, Student-Newman-Keuls method. Values of  $p \leq 0.05$  were considered as significant.

## Results and discussion

One day after seeding, the highest number of initially adhered cells was found on the surface of a bare gold film with  $23000 \pm 1400$  cells/cm<sup>2</sup>, compared to a range from  $7900 \pm 800$  to  $16100 \pm 800$  cells/cm<sup>2</sup> on the modified gold surfaces (FIG. 3).

However, three days after seeding, the number of cells on the carboranethiol-modified gold samples B, C and D ( $24200 \pm 1500$  cells/cm<sup>2</sup> to  $31400 \pm 1500$  cells/cm<sup>2</sup>) was significantly higher than the number on the bare gold film ( $16900 \pm 900$  cells/cm<sup>2</sup>, FIG. 3).

After seven days, the number of cells on the bare gold film and gold films modified with derivatives A, B and D was very similar, all in the range from  $71800 \pm 2400$  cells/cm<sup>2</sup> to  $72300 \pm 2200$  cells/cm<sup>2</sup> (FIG. 3). These cell population densities were significantly higher than the values obtained on standard polystyrene culture dishes. This result is favorable, especially in the case of derivative D. In this molecule, the SH groups are located in para-orientation (FIG. 1), which would facilitate the attachment of the carboranethiol to the gold surface and its simultaneous functionalization with other bioactive groups or molecules in order to further increase the attractiveness of gold surfaces for cell colonization [5-9].



**FIG. 3.** Number and cell spreading area of rat aortic smooth muscle cells on day 1, 3 and 7 after seeding on gold modified by carboranethiol derivatives 1-(HS)-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>11</sub> (A), 1,2-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (B), 9,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (C) and 1,12-(HS)<sub>2</sub>-1,2-C<sub>2</sub>B<sub>10</sub>H<sub>10</sub> (D), polystyrene culture dish (PS) and glass (G). Mean  $\pm$  SEM from 100 measurements performed on 2 samples (cell number) or 57-170 cells from 10 pictures of each sample (spreading area). Statistical significance: ps, g, Au, B, A, D:  $p \leq 0.05$  in comparison with polystyrene dish, glass substrate, bare Au film or carboranethiol derivatives A, B, D.

However, the surface of a gold film modified with carboranethiol C exhibited a significantly smaller number of cells,  $51600 \pm 1900$  cells/cm<sup>2</sup> (FIG. 3). This may be explained by the exposure of the CH vertices of the carborane cluster, which are more acidic than the BH vertices exposed toward the cells in either A or B. Nevertheless, the cells on all tested surfaces were able to form a confluent layer.

The cell spreading areas on day 1 after seeding were significantly larger on the bare gold sample ( $2700 \pm 270 \mu\text{m}^2$ ) than in all remaining experimental groups. In these groups, the cell spreading areas were in the range from  $1650 \pm 80 \mu\text{m}^2$  (on the samples modified with derivative D) to  $2140 \pm 240 \mu\text{m}^2$  (on polystyrene dishes) but these differences were not statistically significant (FIG. 3).

## Conclusion

Modification of a gold surface with carboranethiol derivatives A, B and D increased the population density of rat aortic smooth muscle cells after 7-day-cultivation on these surfaces in comparison with standard polystyrene cell culture dishes. However, on derivative C, the cell population density was significantly lower. This may be associated with the orientation of the carborane cluster, in which the acidic CH vertices face upward from the surface. Carboranethiol derivative D has thiol groups attached in the opposite (i.e., para-) positions, and can be considered as a promising linker for the attachment of various biological molecules to a gold surface.

## Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Acad. Sci. CR (Grant No. KAN400480701). Mr. Robin Healey (Czech Technical University, Prague) is gratefully acknowledged for his language revision of the manuscript.

## References

- [1] Bacakova L., Mares V., Bottone M. G., Pellicciari C., Lisa V., Svorcik V.: J. Biomed. Mater. Res. 49: 369-379, 2000.
- [2] Bacakova L., Walachova K., Svorcik V., Hnatowitz V.: J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 12: 817-834, 2001.
- [3] Bacakova L., Filova E., Rypacek F., Svorcik V., Stary V.: Physiol. Res. 53 Supp: S35-S45, 2004.
- [4] Base T., Bastl Z., Plzak Z., Grygar T., Plesek J., Carr M.J., Malina V., Subrt J., Bohacek J., Vecernikova E., Kriz O.: Langmuir 21: 7776-7785, 2005.
- [5] McGhee A.M., Procter D.J.: Top. Curr. Chem. 264: 93, 2006.
- [6] Rautaray D., Sastry M.: Biotechnol. Prog. 21: 1759-1756, 2005.
- [7] Berry C.C., de la Fuente J.M., Mullin M., Chu S.W., Curtis A.S.: IEEE Trans Nanobioscience 6: 262-269, 2007.
- [8] de la Fuente J.M., Alcantara D., Penades S.: IEEE Trans Nanobioscience 6: 275-281, 2007.
- [9] Park S.Y., Lytton-Jean A.K., Lee B., Weigand S., Schatz G.C., Mirkin C.A.: Nature 451: 553-556, 2008.

## BIOMATERIALS WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY

KATARZYNA WYSOCKA<sup>1</sup>, IGOR BUZALEWICZ<sup>1</sup>, ALINA WIELICZKO<sup>2</sup>, KATARZYNA KOWAL<sup>1</sup>, WIESLAW STRĘK<sup>3</sup>, HALINA PODBIELSKA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND INSTRUMENTATION, BIO-OPTICS GROUP, 27 WYBRZEZE WYSPIANSKIEGO, 50-370 WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup>WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT OF EPIZOOTIOLOGY AND VETERINARY ADMINISTRATION WITH CLINIC, 45 GRUNWALDZKI SQ., 50-366 WROCLAW, POLAND

<sup>3</sup>POLISH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF LOW TEMPERATURE AND STRUCTURE RESEARCH, 2 OKÓLNA STR., 50-422 WROCLAW, POLAND

\* E-MAIL: HALINA.PODBIELSKA@PWR.WROC.PL

## Abstract

*The sol-gel derived silica spheres with surfaces modified by silver nanoparticles were used to enhance the photodynamic effect. The silica nanoparticles were prepared by modified Stöber synthesis. The diameter of obtained silica spheres was ca. 100 nm. These silica spheres we used as a carrier for noble nanoparticles. It was shown that Ag-Au nanoparticles have an antibacterial activity against Escherichia coli. This effect depends on the nanoparticles concentration and it is stronger for higher concentrations. Laser irradiation enhances this effect, and starting from certain concentration it is possible to kill Escherichia coli, totally, when using laser light.*

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 119-121]

## Introduction

Recently, many new developments in nanomedicine are observed. One of the promising application of nanomaterials is in photodynamic medicine, where the nanoparticles may enhance the photodynamic activity [1-3]. Photodynamic therapy (PDT) over the past decades was mainly exploited for treatment of tumors. It can be also suitable for the inactivation of microbes by photodynamic activity. Antimicrobial photodynamic therapy (APDT) combines a nontoxic photoactive dye - photosensitizer to generate singlet oxygen and free radicals after light exposure that kill microbial cells [4-8]. In this paper we will demonstrate that silver-doped nanoparticles have antimicrobial activity and this effect may be enhanced by adding a photosensitive agent and exposing the bacteria culture to the light.

## Materials

First, the silica nanoparticles were prepared by modified Stöber synthesis [9] from ethyl alcohol (95%, Polish Chemicals), ammonium water (25%, Polish Chemicals), hydrofluoric acid (35%, Polish Chemicals) and tetraethyl-ortosilane (TEOS from Aldrich) mixed at room temperature prepared. Next, the Tollen's method for silica silver doped nanospheres production was exploited [10]. The preparation process used in this study is described in [11]. For reduction reactions glucose was used as the reducing agent. In second reduction reaction to the solution Ag-SiO<sub>2</sub> 0.5M of AgNO<sub>3</sub> and 25% NH<sub>4</sub>OH were added. For cementation process "gold liquid" (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+HAuCl<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O) was added.

As a photosensitive agents Photolon (18-carboxy-20-(carboxymethyl)-8-ethenyl-13-ethyl-2,3-dihydro-3,7,12,17-tetramethyl-21H, 23H-porphin-2-propionic acid) from Haemato, Poland was used. The diameter of silica nanoparticles was ca. 100nm. The concentration of noble particles is depicted in TABS. 1 and 2.

## Method

The study was performed on *Escherichia coli* cultures. First, the bacteria were cultured in the presence of nanoparticles. The ordinary procedure for bacteria culturing, seeding and incubation were exploited. For irradiation 410 nm wavelength from TopGan laser was used, with peak optical power 200mW. The exposure time was 4 minutes. The nanomaterials in various concentrations were added to the bacterial suspension and then the bacteria were seeded on agar plates and the samples were incubated. To 1ml of suspension 0,25, 0,5 or 1ml of supernatant was added. The CFU indices (colony forming units) were estimated.

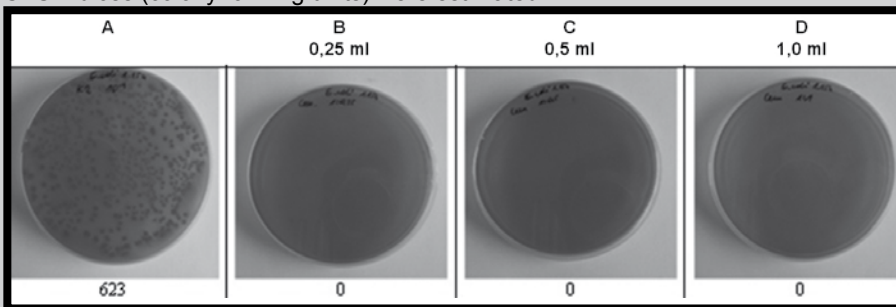


FIG. 1. Exemplary results: Ag-SiO<sub>2</sub>-Au was added to *E. coli* suspension. A – control, B, C, D – samples cultured in the presence of nanoparticles.

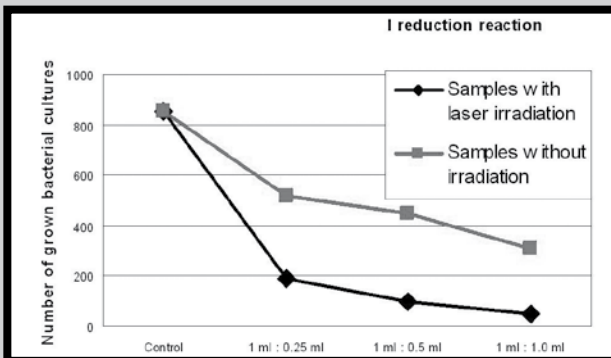


FIG. 2. Samples after I reduction. The influence of laser irradiation.

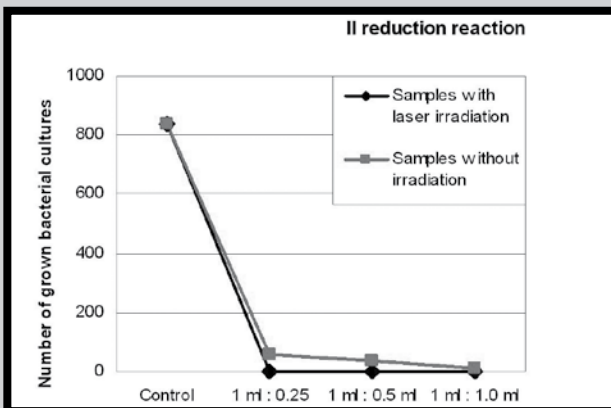


FIG. 3. Samples after II reduction. The influence of laser irradiation.

TABLE 1. Ag concentration in sediments.

Sediment samples	Concentration Ag [mg/dm <sup>3</sup> ]	Concentration Au [mg/dm <sup>3</sup> ]
Impregnation process	10.8	-
I reduction reaction	9.4	-
II reduction reaction	35.6	-
Cementation process	8.7	16.3

TABLE 2. Ag concentration in supernatants.

Supernatant	Concentration Ag [mg/dm <sup>3</sup> ]	Concentration Au [mg/dm <sup>3</sup> ]
I reduction reaction	5.3	-
II reduction reaction	2.6	-
Cementation process	1.4	1.8

## Results

Exemplary results are shown in FIG. 1. The picture A demonstrates the *E. coli* in control sample, where as B, C and D are the culture incubated with nanoparticles.

The results demonstrating that the light irradiation has even more strong antibacterial effect are depicted on FIGS. 2-4.

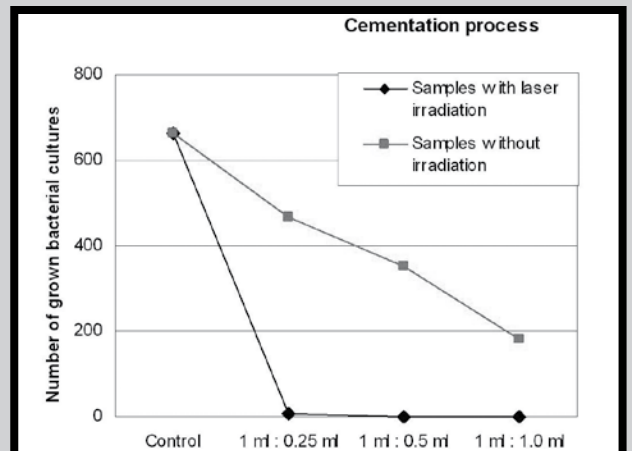


FIG. 4. Samples after cementation. The influence of laser irradiation.

## Conclusions

In this work it was shown that Ag-Au nanoparticles have an antibacterial activity against *Escherichia coli*. This effect depends on the nanoparticles concentration and it is stronger for higher concentrations. Laser irradiation enhances this effect, and starting from certain concentration it is possible to kill *Escherichia coli*, totally, when using laser light.

## Acknowledgements

The work was supported by the Polish Ministry of Education and Scientific Research, Grant No. N N518 327335.

## References

- [1] Kopelman R., Lee Koo Y.-E., Philbert M., Moffat B.A., Ramachandra Reddy G., McConville P., Hall D.E., Ross B.D. Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293 (1), 2005, pp. 404-410.
- [2] Tang, W., Xu, H., Park, E.J., Philbert, M.A., Kopelman, R. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 369 (2), 2008, pp. 579-583.
- [3] Oba, T., Photosensitizer nanoparticles for photodynamic therapy, *Current Bioactive Compounds* 3 (4), 2007, pp. 239-251
- [4] Taylor P W, Stapleton P D, Luzio P. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today* 2002;7:1086-1091.
- [5] Merchat M, Bertoloni G, Giacomini P, Villanueva A, Jori G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996;32:153-157.
- [6] Minnock A, Vernon Di, Scholfield J, Griffiths J, Parish Jh, Brown Sb. Photoinactivation of bacteria. Use of cationic water-soluble zinc phthalocyanines to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996;32:159-164.
- [7] Merchat M, Spikes G, Bertoloni G, Jori J. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996;35:149-157.
- [8] Ulatowska-Jarza A., Zychowicz J, Hołowacz I., Bauer J., Razik J, Wieliczko A, Podbielska H., Muller G, Stręk W, Bindig U: Antimicrobial PDT with chlorophyll-derived photosensitizer and semiconductor laser, *Med. Laser Appl.* 2006 vol. 21 s. 177-183.
- [9] Stöber W., Fink A., Bohn E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 1968, pp. 62-69.
- [10] Peterson M.S.M., Bouwman J., Chen A., Deutsch M., Inorganic metalodielectric materials fabricated using two single-step methods based on the Tollen's process, *Journal of Colloid and Interface Science* 306, 2007, s. 41-49.
- [11] Wysocka K., Bindig U., Bauer J., Stręk W., Kowal K., Podbielska H., Silver based nanomaterials - fluorescence enhancement in silver doped silica based nanobiomaterials, *Conference on Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine*, Ryto, 2008.

## COMPARATIVE STUDY OF HYDROXYAPATITE AND HYDROXYAPATITE MIXED WITH BIOGLASS COATINGS OF METALLIC IMPLANTS, DEPOSITED BY PLD METHOD

W. MRÓZ<sup>1</sup>, M. JEDYŃSKI<sup>1\*</sup>, S. BURDYŃSKA<sup>1</sup>, A. PROKOPIUK<sup>1</sup>, A. ŚLÓSARCZYK<sup>2</sup>, E. MENASZEK<sup>3</sup>, A. ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>4</sup>, M. ŁĄCZKA<sup>2</sup>, K. CHOLEWA-KOWALSKA<sup>2</sup>, A. NIEDZIŁSKA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> MILITARY UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, INSTITUTE OF OPTOELECTRONICS,

2 KALISKIEGO STR., 01-489 WARSZAW, POLAND

<sup>2</sup> AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, 30 MICKIEWICZA AV., 30-059 CRACOW, POLAND

<sup>3</sup> JAGIELLONIAN UNIVERSITY, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY, 9 MEDYCZNA STR., 30-688 CRACOW, POLAND

<sup>4</sup> ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, DEPARTMENT OF ANATOMY, 78 JANA PAWLA II AV., 31-571 CRACOW, POLAND

<sup>5</sup> TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ,

INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, 1/15 STEFANOWSKIEGO STR., 90-924 LODZ, POLAND

\* E-MAIL: MJEDYNSKI@WAT.EDU.PL

## Abstract

*Hydroxyapatite and bioglasses are important bioactive materials as they exhibit direct bonding with human bone. Therefore they are used as coatings for metallic implants. The aim of the present study was to compare two types of layers: monophase hydroxyapatite (HA) and composite-type HA+BG hydroxyapatite mixed with bioglass (BG) (BG 50% of weight) during the initial stage of their interaction with cell medium. In vitro studies were performed in order to determine the effect of the investigated layers on cell response.*

*After 3 and 7 days the behaviour of the cells grown on the above surfaces was estimated through determination of the cell adhesion (CV colorimetric assay). Cell morphology and properties of biomaterials surfaces were analysed by atomic force microscopy (AFM).*

*[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 121-123]*

## Introduction

Steel as well as titanium-based alloys are widely used as materials for implants because of their good mechanical properties. Unfortunately, they are not bioactive and therefore need to be coated with bioactive layers such as hydroxyapatite (HA) and/or bioactive glasses.

The chemical and structural characteristics of HA promote chemical bonding to adjacent bone tissue [1,2], which leads to direct attachment to bone. Some glasses are also considered as bioactive materials. Ceramics in the SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> system are the class of biocompatible materials that can be used as coatings on metallic implants [3]. As a glassy phase, bioglasses can reveal high surface reactivity, which causes a strong attachment to surrounding bone tissue. It is possible to design bioglasses with properties useful for particular medical application [4]. In this work a novel approach of bioglass reinforced hydroxyapatite was used to increase osteoblasts response.

Among many techniques pulsed laser deposition (PLD) is commonly used for deposition HA films [5,6]. The physical as well as chemical properties of obtained coatings can be controlled by changing conditions of PLD method and a composition of target [7]. The crucial parameters of the PLD process are pressure of ambient gas, laser fluence, substrate temperature and laser wavelength [8,9].

The aim of this paper was to perform and evaluate ceramic coatings deposited by PLD method with the use of monophase HA and composite-type HA+BG targets. In this paper the topography of obtained coatings as well as initial stage of interaction with cell culture medium is shown.

## Materials and methods

Two targets of different chemical composition were used for deposition of coatings: the first one consisted of pure HA (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) while the second was the composition type HA mixed with 50%wt. of BG. The composition of BG was following: SiO<sub>2</sub>-80mol%, CaO-16mol% and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-4mol%. The target materials were deposited by use of pulsed excimer ArF laser which operated at the wavelength of 193nm with the pulse energy of ~300mJ and 20ns of pulse duration (FWHM). The laser fluence was 4±0,5J/cm<sup>2</sup> and the laser beam was focused of 40° out of the normal surface of the target. All layers were deposited on 316L stainless steel substrates with nanocrystalline diamond (NCD) buffer layer which thickness was 300nm. The NCD layers were deposited by RF PACVD method described by



Mitura et al. [10]. The distance between target and substrate was 6 cm and the substrates were maintained at elevated temperature of  $400 \pm 30^\circ\text{C}$  in order to obtain polycrystalline structure of deposited HA. The thickness of obtained HA and HA+BG layers was approximately  $1 \mu\text{m}$ . The deposition process was carried out in water vapour atmosphere which pressure was 30 Pa.

The ability to promote cell adhesion of stainless steel substrates with modified surfaces was compared by assessing the attachment of osteoblast-like cells. The details of performed *in vitro* test are presented in [11].

## Results

### Surface characterization

The layers deposited from the HA target were characterized by nanocrystalline structure with a crystallite size of about 100 nm and relatively high diversification of height of grains (FIG. 1a). The above coatings obtained at  $400^\circ\text{C}$  consisted of polycrystalline HA phase as a main component of these layers [12].

The surface of coatings obtained from HA mixed with BG layer is shown in FIG. 2. This layer was characterized by polycrystalline structure with grain size ranged between 200 nm and 300 nm and uniform height of grains (FIG. 2a). The round shape of grains indicates the equilibrium growth of grains. The average roughness of this surface was higher than in the case of the former one (TAB. 1). From the phase map one can deduce that obtained layers were dominated by only one material phase (FIG. 2b).

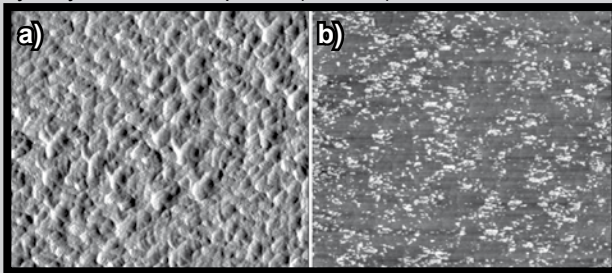


FIG. 1. Hydroxyapatite deposited on 316L stainless steel with NCD buffer layer: a) AFM image, b) phase map.

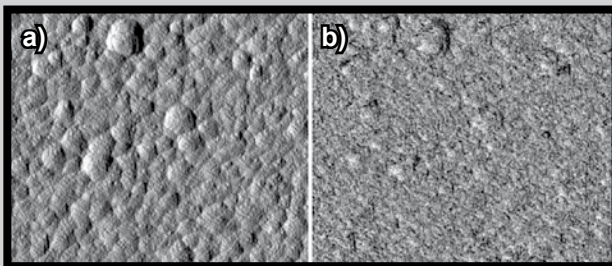


FIG. 2. Hydroxyapatite mixed with bioglass deposited on 316L stainless steel with NCD buffer layer: a) AFM image, b) phase map.

TABLE 1. AFM roughness of  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  areas of the layers.

Layer	Roughness $R_a$ [nm]
HA	6,9
HA+BG	10,0
HA 3 days of culture	32,5
HA+BG 3 days of culture	20,3
HA 7 days of culture	47,2
HA+BG 7 days of culture	45,1

### Cell cultures

Osteoblasts attached to the HA+BG surface observed after 3 days of culture, were characterized by irregular elongated shape (FIG. 3b). The size of the cells was about  $50 \mu\text{m}$ . The convex "islands" were visible inside each osteoblast. Two distinct islands were analyzed and presented in FIG. 4.

Topography of observed "islands" indicated their nanocrystalline structure. The visible larger structures were composed of very thin crystallites, parallel to the substrate (FIG. 4).

After 3 days of culture lower number (of about 25%) of osteoblasts were attached to the analysed HA surface. Observed cells were oval and their size was about  $10 \mu\text{m}$  (FIG. 3a).

After 7 days of culture the area of osteoblasts on HA+BG layer decreased and the cells were circular (FIG. 5c). Inside each cell the convex "islands" were still visible (FIG. 5d). The osteoblasts cultured on HA layer showed also circular shape but their area was constant. In the case of 7 days of culture the "islands" had triangular shape with layer-like structure (FIG. 5b,d). In both cases the "islands" consisted of elongated crystallites with mono phase composition (FIG. 6).

### Cell adhesion

Results of this study provide the evidence of increased osteoblasts adhesion on hydroxyapatite mixed with bioglass layer after 3 days of culture (FIG. 3). Osteoblasts adhesion was significantly greater on HA+BG layer when compared to polycrystalline HA and polystyrene commercial 48-well cell culture plates (TCPS) used as a control.

CV test performed after 7 days of culture didn't differ significantly for HA and HA+BG (FIG. 7) but were still better than in the case of TCPS. Nevertheless, one may observe that all CV test values after 7 days of culture were greater than the corresponding values obtained after 3 days.

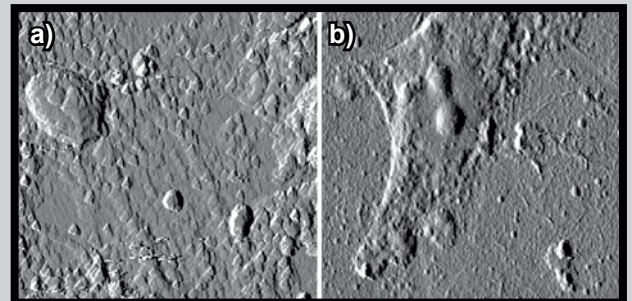


FIG. 3. Osteoblasts developed on HA (a) and HA+BG (b) after 3 days of culture.

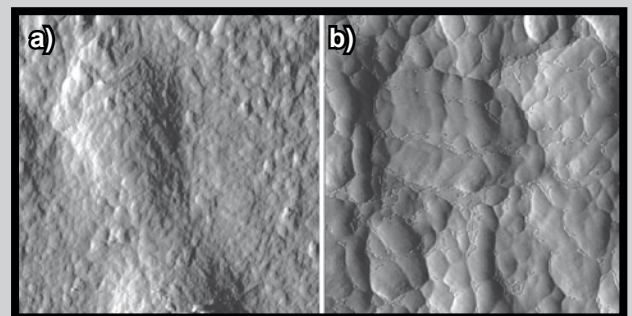
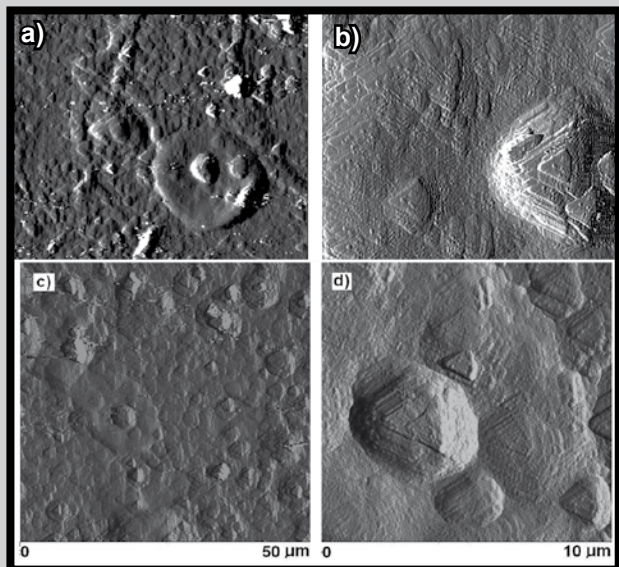
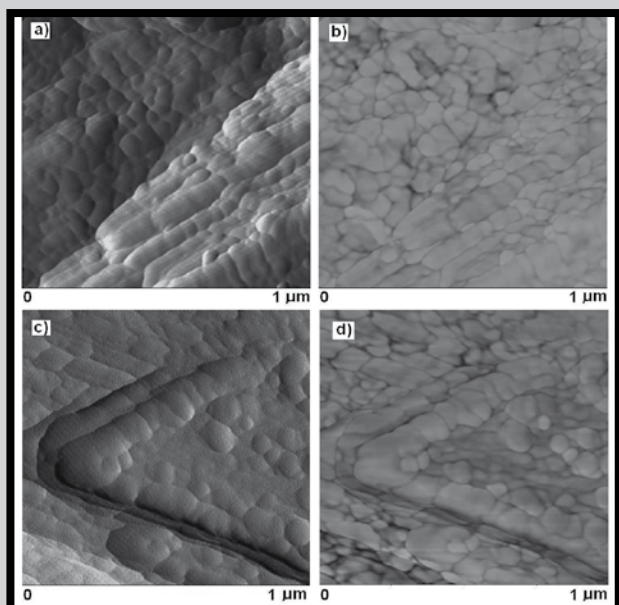


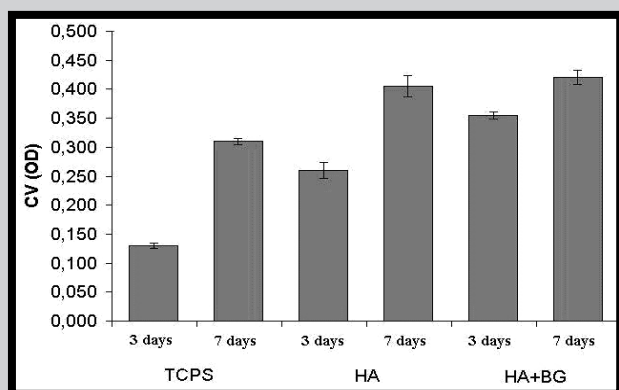
FIG. 4. The "islands" on osteoblast developed on HA+BG after 3 days of culture (a) and their structure (b).



**FIG. 5.** Osteoblasts developed on HA (a) and HA+BG (c) after 7 days of culture and their island structure: b) HA, d) HA+BG.



**FIG. 6.** Islands on osteoblasts developed after 7 days of culture: a) HA layer, b) phase map of HA layer, c) HA+BG layer, d) phase map of HA+BG layer.



**FIG. 7.** Osteoblasts adhesion on HA, HA+BG and TCPS after 3 and 7 days of culture.

## Conclusions

The present study provided the evidence of increased osteoblasts adhesion to the layers composed of hydroxyapatite mixed with bioglass compared to the pure hydroxyapatite surface. Both, HA+BG and HA coatings were characterized by better cell adhesion than TCPS used as a reference material. The difference in osteoblasts adhesion to HA+BG and HA decreased after 7 days of culture nevertheless was still better for HA+BG material.

## Acknowledgments

The research was financed by the Polish Ministry of Science and Higher Education project No. T00 C 004 29 and Eureka project no. 57/N-Eureka/2007.

## References

- [1] Chang C, Wu J, Mao D, Ding C. Mechanical and Histological evaluations of Hydroxyapatite-coated and noncoated Ti6Al4V implants in tibia bone. *J Biomed Mater Res* 2001; 56: 17-23.
- [2] Ducheyne P, Beight J, Cuckler J, Evans B, Radin S. The effect of calcium phosphate coating characteristics on early postoperative bone tissue ingrowth. *Biomaterials* 1990; 11: 531-540.
- [3] Hench LL. Bioactive glass and glass-ceramics: a perspective, in: Yamamuro T, Hench LL, Wilson J (Eds.), *Handbook of Bioactive Ceramics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990; 7.
- [4] Elbatal HA, Azooz MA, Khalil EMA, Monem AS, Hamdy YM. Characterization of some bioglass-ceramics. *Mater Chem Phys* 2003; 80: 599.
- [5] Eason R (ed.). *Pulsed Laser Deposition of Thin Films. Applications-led growth of functional materials* 2007, Willey, New Jersey.
- [6] Cleries L, Martinez E, Fernandez JM, Sardin G, Esteve J, Morrenza JL. Mechanical properties of calcium phosphate coatings deposited by laser ablation. *Biomaterials* 2000; 21: 967-971.
- [7] Mróz W, Jedyński M, Prokopiuk A, Ślósarczyk A, Paszkiewicz Z. Characterization of calcium phosphate coatings doped with Mg, deposited by pulsed laser deposition technique using ArF excimer laser. *Micron* (2008), doi: 10.1016/j.micron.2008.01.016
- [8] Jelinek M, Olsan V, Jastrabik L, Studnicka V, Hnatowicz V, Kvitek J, Havranek V, Dostalova T, Zergioti I, Petrakis A, Hontzopoulos E, Fotakis C. Effect of processing parameters on the properties of hydroxylapatite films grown by pulsed laser deposition. *Thin Solid Films* 1995; 257: 125-129.
- [9] Mróz W. Physics of deposition of hydroxyapatite layers by pulse laser deposition method", in "Functional Properties of Nanostructured Materials, ed. by R. Kassing, P. Petkov, W. Kulisch, C. Popov. NATO Science Series II Mathematics, Physics and Chemistry 2006; 223: 183-196.
- [10] Mitura A, Mitura E, Mitura A. Manufacture of amorphous carbon layers by r.f. dense plasma CVD. *Diamond and Related Materials* 1995; 4: 302-303.
- [11] Plytycz B, Rozanowska M, Seljelid R. Quantification of neutral red pinocytosis by small numbers of adherent cells. *Comparative studies. Folia Biol* 1992; 40: 3-9.
- [12] Mayor B, Arias J, Chiussi S, Garcia F, Pou J, Leon Fong B, Perez-Amor M. Calcium phosphate coatings grown at different substrate temperatures by pulsed ArF-laser deposition. *Thin Solid Films* 1998; 317: 363-366.

# SILVER BASED NANOMATERIALS - FLUORESCENCE ENHANCEMENT IN SILVER DOPED SILICA BASED NANOBIOMATERIALS

KATARZYNA WYSOCKA<sup>1\*</sup>, UWE BINDIG<sup>2</sup>, JOANNA BAUER<sup>1</sup>,  
WIESŁAW STRĘK<sup>3</sup>, KATARZYNA KOWAL<sup>1</sup>, HALINA PODBIELSKA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
INSTITUTE OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND INSTRUMENTATION,  
BIO-OPTICS GROUP, 27 WYBRZEŻE WYSPIAŃSKIEGO,  
50-370 WROCLAW, POLAND

<sup>2</sup> LASER-UND MEDIZIN-TECHNOLOGIE GMBH, BERLIN,  
60-62 FABECKSTR., 14195 BERLIN, GERMANY

<sup>3</sup> POLISH ACADEMY OF SCIENCES,  
INSTITUTE OF LOW TEMPERATURE AND STRUCTURE RESEARCH,  
2 OKÓLNA STR., 50-422 WROCLAW, POLAND

\* E-MAIL: KATARZYNA.WYSOCKA@PWR.WROC.PL

## Abstract

*The sol-gel derived silica spheres with surfaces modified by silver nanoparticles were used to enhance the emission efficiency of PDT photosensitizer Photolon. Two various materials with different Ag concentrations were prepared by exploiting the Tollen's method. The silica nanoparticles were prepared by modified Stöber synthesis. The diameter of obtained silica spheres was ca. 100nm. These silica spheres we used as a carrier for noble nanoparticles, since they can be easily doped by various substances that can change their physical and chemical properties. The colloidal water solutions of Ag-doped SiO<sub>2</sub> particles have been prepared. It was demonstrated that the fluorescence intensity of Photolon is influenced by silver nanoparticles concentration, however it is not proportional to the silver concentration. The fluorescence intensity of Photolon with silver doped silica nanoparticles is much higher than fluorescence intensity of Photolon in water solution. This result is very promising and may be used to enhance the photodynamic effect.*

[Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 124-125]

## Introduction

Recently, there is a big interest in nanomaterials and nanobiotechnologies. The preparation procedures and characterization of various nanopowders are extensively discussed. Silica particles may be easily doped by various substances that can change their properties and they may be used in many applications, including optics, catalysis or biotechnology. For instance, nanosized metallic silver or silver-gold has been known to have powerful antibacterial activity [1] but may also allow to enhance singlet oxygen generation, what may be used for sterilization. In this work, the sol-gel derived silica spheres with surface-modified by silver nanoparticles were used to enhance the emission efficiency of Photolon photosensitizer.

## Materials

The silica nanoparticles were prepared by modified Stöber synthesis [2]. The silica nanoparticles were prepared

by the successive addition of ethyl alcohol (95%, Polish Chemicals), ammonium water (25%, Polish Chemicals), hydrofluoric acid (35%, Polish Chemicals) and tetraethyl-ortosilane (TEOS from Aldrich) at room temperature. Next, silica nanoparticles sediment was rinsed in methyl alcohol, and after that dried 24 hours in 70°C. Tollen's method for silica silver doped nanospheres production was exploited [3]. Silica spheres were dispersed in water solution and silver ammonia complex  $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$  [0.4mol] was added. Glucose solution at room temperature was used as the reducing agent. When the so-called first reduction reaction had started, a progression of color changes were observed.

The materials after first reduction reaction were used to second reduction reaction. To the Ag-SiO<sub>2</sub> (after first reduction reaction), the silver nitrate [0.5mol], ammonium water (25%) and solutions of glucose were added. After 24 hours of incubation at 70°C temperature silica spheres with silver nanoparticles were prepared.

The colloidal water solutions of Ag-doped SiO<sub>2</sub> particles with different dispersed phase concentration have been prepared. The concentration of metals in supernatant liquid compound of Ag-SiO<sub>2</sub> was determined by means of Atomic Absorption. Total concentration a silver nanoparticles in supernatant liquid Ag-SiO<sub>2</sub> after I reduction reaction was 5.3 [mg/dm<sup>3</sup>], and after II reduction reaction was 2.6 [mg/dm<sup>3</sup>].

The photosensitive agents Photolon (18-carboxy-20-(carboxymethyl)-8-ethenyl-13-ethyl-2,3-dihydro-3, 7, 12, 17 – tetramethyl - 21H, 23H – porphin–2-propionic acid) from Haemato, Poland) was used as dopant. Stock solutions 0.01% of Photolon were prepared by dissolving the photosensitizer in distilled water. 1ml photosensitive dye was added to the fresh prepared silica spheres with Ag-doped nanoparticles. The concentration of metallic silver was changed (TABLE 1). Emission spectra under 404nm laser excitation have been measured and the Metal-Enhanced Fluorescence was observed.

TABLE 1. Samples specification.

I reduction reaction		II reduction reaction	
Sample	Ag [µg/ml]	Sample	Ag [µg/ml]
A	21.2	G	10.4
B	31.8	H	15.6
C	42.4	I	20.8
D	53.0	J	26.0
E	79.5	K	39.0
F	106.0	L	52.0

## Results

The absorption spectra of Photolon solutions were obtained by means of Lambda 2 (Perkin Elmer, UK) spectrophotometer. UV-VIS absorption spectra of Photolon with Ag-doped nanospheres are shown on FIG. 1. The Soret band and additional absorption bands in the wavelengths range 500–700nm (Q-bands) were observed. Two prominent absorptions, at 403nm (Soret band) and at 655nm (chlorine-type band), are visible. The others peaks at 536 and at 601nm are observed, as well.

Fluorescence spectra were obtained by means of a fluorescence spectrometer LS-50B (Perkin Elmer/UK). Fluorescence of Photolon (concentration 0.01%) spectra with Ag-doped silica nanoparticles are depicted on FIG. 2.

Analysis of the recorded spectra revealed the fact that the fluorescence intensity strongly depends on the concentration of Ag nanoparticles, however it is not linear.

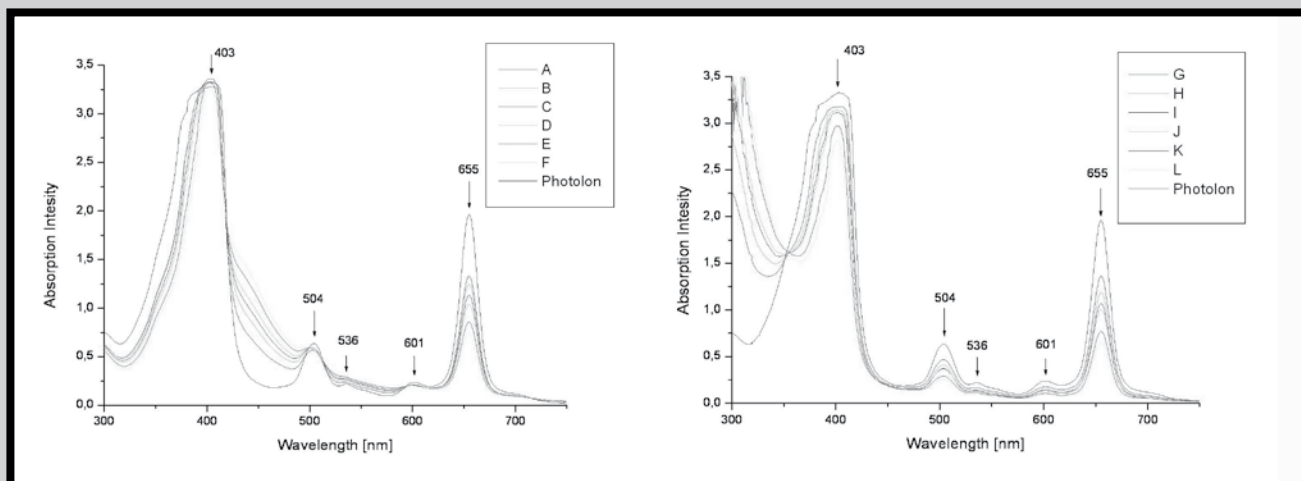


FIG. 1. UV-VIS absorption spectra of Photolon in with of Ag-doped silica nanoparticles. For sample description see TAB. 1.

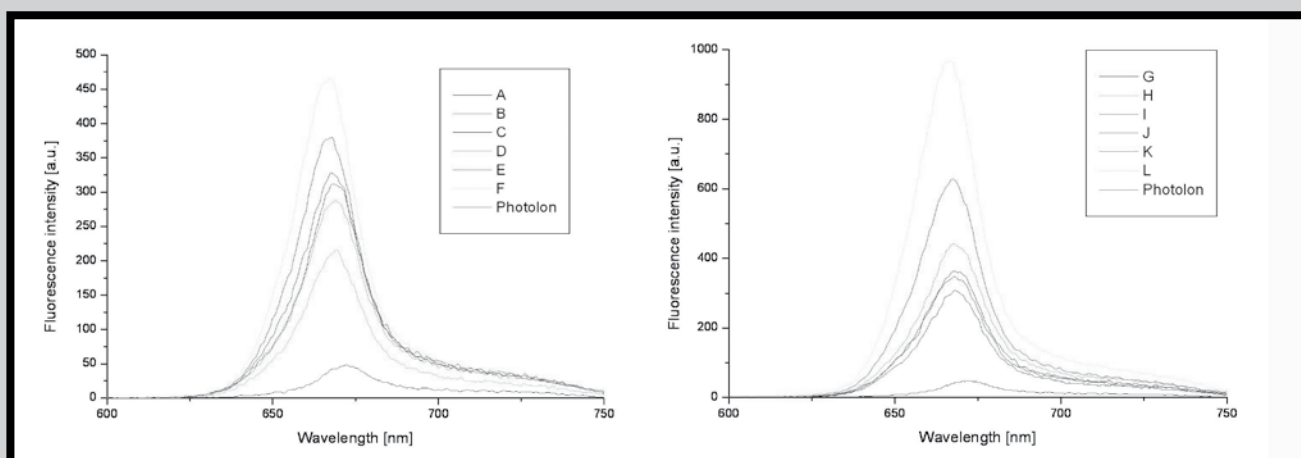


FIG. 2. Emission spectra of Photolon in with of Ag-doped silica nanoparticles.

## Conclusions

This work was focused on the measurement of the fluorescence properties of noble metal-doped silica nanoparticles. The emission spectra under 404nm laser excitation have been measured and the metal fluorescence enhancement MEF was observed. The fluorescence intensity of Photolon is influenced by the silver concentration.

MEF is believed to occur due to a coupling of the fluorophore with the plasmon resonance from a metal particle, and the enhancement scale depends on the particle size and shape [4]. The plasmon resonance of a metal particle represents the existence of an electromagnetic field near the metal particle. MEF is caused by increasing the excitation and emission rate of the fluorophore in a localized electromagnetic field [5,6]. When the metal particles are in close proximity to each other, the localized electromagnetic fields from individual particles are expected to overlap and result in a denser overlapped field. Fluorescence is enhanced more efficiently when the fluorophore is localized in such an overlapped field [7,8].

## Acknowledgements

The authors thank dr Jerzy Kowalczyk from Polish Academy of Sciences in Wrocław for his technical and support. The work was supported by the Polish Ministry of Education and Scientific Research, Grant No. N N518 327335.

## References

- [1] Kawashita M., Toda S., Kim H.-M., Kokubo T., Masuda N., Preparation of Antibacterial Silver-Doped Silica Glass Microspheres, *Journal of Biomedical Materials Research* 66, 2003, pp. 266-274.
- [2] Stöber W., Fink A., Bohn E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 1968, pp. 62-69.
- [3] Peterson M.S.M., Bouwman J., Chen A., Deutsch M., Inorganic metal/dielectric materials fabricated using two single-step methods based on the Tollen's process, *Journal of Colloid and Interface Science* 306, 2007, s. 41-49.
- [4] Kerker M., Blatchford C.G., Elastic scattering, absorption, and surface-enhanced Raman scattering by concentric spheres comprised of a metallic and a dielectric region, *Physical Review B* 26, 1982, pp. 4052-4063.
- [5] Malicka, J., Gryczynski I., Gryczynski Z., Lakowicz J.R., Effects of Fluorophore-to-silver Distance on the Emission of Cyanine-dye-labeled Oligonucleotides, *Analytical Biochemistry* 315, 2003, pp. 57-66.
- [6] Messinger B.I., von Raben K.U., Chang R.K., Barber P.W., Local fields at the surface of noble-metal microspheres, *Physical Review B* 24, 1981, pp. 649-657.
- [7] Lakowicz J.R., Radiative Decay Engineering 5: Metal-Enhanced Fluorescence and Plasmon Emission, *Anal. Biochem.* 337, 2005, pp. 171.
- [8] Evanoff D.D., Jr.; White R.L., Chumanov G.J., Measuring the Distance Dependence of the Local Electromagnetic Field from Silver Nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry B* 108, 2004, pp. 1522-1524.

# THE EFFECT OF TITANIUM ALLOY MODIFIED WITH a-C:N:H AND a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) COATINGS ON ADHESION AND IMMUNE RESPONSE OF HUMAN OSTEOBLAST-LIKE MG-63 CELLS

ANNA ŚCISŁOWSKA-CZARNECKA<sup>1</sup>, ELŻBIETA MENASZEK<sup>2</sup>,  
ELŻBIETA KOŁACZKOWSKA<sup>3</sup>, MARTA JANUŚ<sup>4</sup>, BARBARA STYPUŁA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF ANATOMY, ACADEMY OF PHYSICAL EDUCATION, CRACOW, POLAND

<sup>2</sup> DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

<sup>3</sup> DEPARTMENT OF EVOLUTIONARY IMMUNOBIOLOGY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, CRACOW, POLAND

<sup>4</sup> DEPARTMENT OF TECHNOLOGY OF CERAMICS AND REFRACTORIES, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW, POLAND

<sup>5</sup> DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND CORROSION OF METALS, AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW, POLAND

## Abstract

*The study was conducted in order to determine the effects of modified titanium alloy (Ti-6Al-4V) surfaces on the biological response of a human osteoblast-like cell line. MG-63 cells were cultured on disk-shaped Ti-alloys: unmodified, and covered with a-C:N:H or a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layers. Interactions between materials and cells were examined through determination of cells adhesion and secretion of cytokines involved in the development of immune response.*

**Keywords:** titanium alloy, a-C:N:H and a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) coatings, osteoblast-like MG-63 cells, cell adhesion, cytokines

[*Engineering of Biomaterials, 81-84, (2008), 126-128*]

## Introduction

Titanium and its alloys are widely used as a material for implants because of their mechanical properties, high strength-to-weight ratio, biocompatibility, and high corrosion resistance [1-3]. Despite numerous advantages, titanium and its alloys can not be used without limitations. This is connected with a possibility of metallosis and other diseases caused by a movement of metal ions to the surrounding tissues. Many efforts have been made to improve the biocompatibility of titanium and its alloys, mainly by modifying the topography and physicochemical properties to promote cell activity at the surface of implants. The surface treatment may be achieved with one of the following techniques: nitriding, oxygenating, carbonating, nitro-carbonating or deposition of carefully tailored layers [4]. There is a growing interest in search of new layer materials of complex chemical composition, containing elements of various groups of periodic table. Most of the studies are focused on four elements: carbon, hydrogen, silicon and nitrogen [5]. The objective of our study was to estimate the effect of Ti-alloy surface modification achieved by the application of a-C:N:H and a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layers on adherence and activity of MG-63 osteoblast-like cells.

## Materials and methods

### Surface modification

Titanium alloy (Ti-6Al-4V) disks, 13mm in diameter and 3mm in thickness, were used in the study. The disks were mechanically polished, cleaned in isopropyl alcohol and next covered with two types of layers: a-C:N:H and a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H). The layers were grown with application of plasma assisted chemical vapour deposition: RFCVD (13,56MHz, 60W, and cathode autopotential about -300mV) and MWCVD (2,45GHz, 800W). The mixtures of gaseous CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> or CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>, SiH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> respectively, provided at various proportions were used in the syntheses. Disks with non-modified surface were used as a reference material. Before the *in vitro* experiment examined disks were sterilized in autoclave and afterwards placed in 24-well plates (Nunclon, Denmark).

### Cell culture

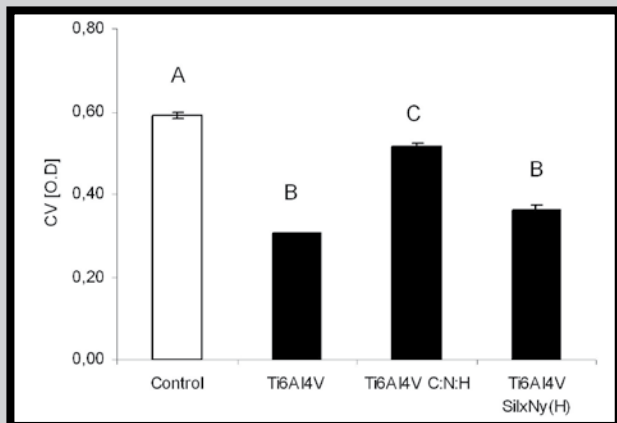
The ability to promote cell adhesion and cytokine production of titanium alloy disks with modified surfaces was compared using MG-63 osteoblast-like cells.

The cells were routinely grown in 75 mL flask in Dulbecco's Modified Eagle Medium with glucose and L-Glutamine (PAA, Austria), 10% foetal bovine serum (PAA, Austria), 10 U/mL penicillin, and 10U/mL streptomycin (Sigma, Germany) in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere at 37°C. A flask of cells was brought into suspension after incubating for 5min in 0.5% trypsin plus EDTA (PAA, Austria). Following trypsinization, cells were washed by centrifugation at 400g for 5 min to give a pellet that was resuspended in fresh supplemented medium to a concentration of 3x10<sup>4</sup> cells/mL. Next, 1ml of cell suspension was added to each well of 24-well plates (Nunclon, Denmark) containing sterile Ti-alloy samples. Tissue culture polystyrene (TCPS) bottom of wells served as a positive control. Cultures were performed for 3 or 7 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> and 95% air atmosphere.

### Adhesion of cells and cytokine production

At the selected time points (3 or 7 days), supernatants from above cells cultured on biomaterials were collected and frozen for cytokines evaluation. Next, the colorimetric assay measuring cell adherence was performed. Estimation of adherent cell mass was achieved by crystal violet staining/extraction (CV test) [6]. Cells cultured on studied materials were washed twice with PBS, fixed in 2% paraformaldehyde for 1h, stained with 0.5% crystal violet in 20% methanol for 5min, washed with tap water, and dried. The dye was extracted from the cells with 100% methanol and optical density was measured on an Expert Plus spectrophotometer (Asys Hitech, Austria) at 570nm.

The level of cytokine production was estimated in cell-culture supernatants by flow cytometry. Human Inflammation Kit (Cytometric Bead Array, BD Biosciences, USA) was used to quantitatively measure 6 cytokines important for the process of inflammation. The method which allows to detect the presence of 6 cytokines in a single sample is based on fluorescence of beads coated with capture antibodies specific for: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), and Tumor Necrosis Factor (TNF) proteins. The six bead populations were mixed together and resolved in the F3 channel of a flow cytometer BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, USA). The capture beads, phycoerythrin-conjugated detection antibodies, and recombinant standards or test samples were incubated together to form sandwich complexes. The presence of specific cytokine in the sample was detected owing to double signal for FL-3 and FL-2 lasers.



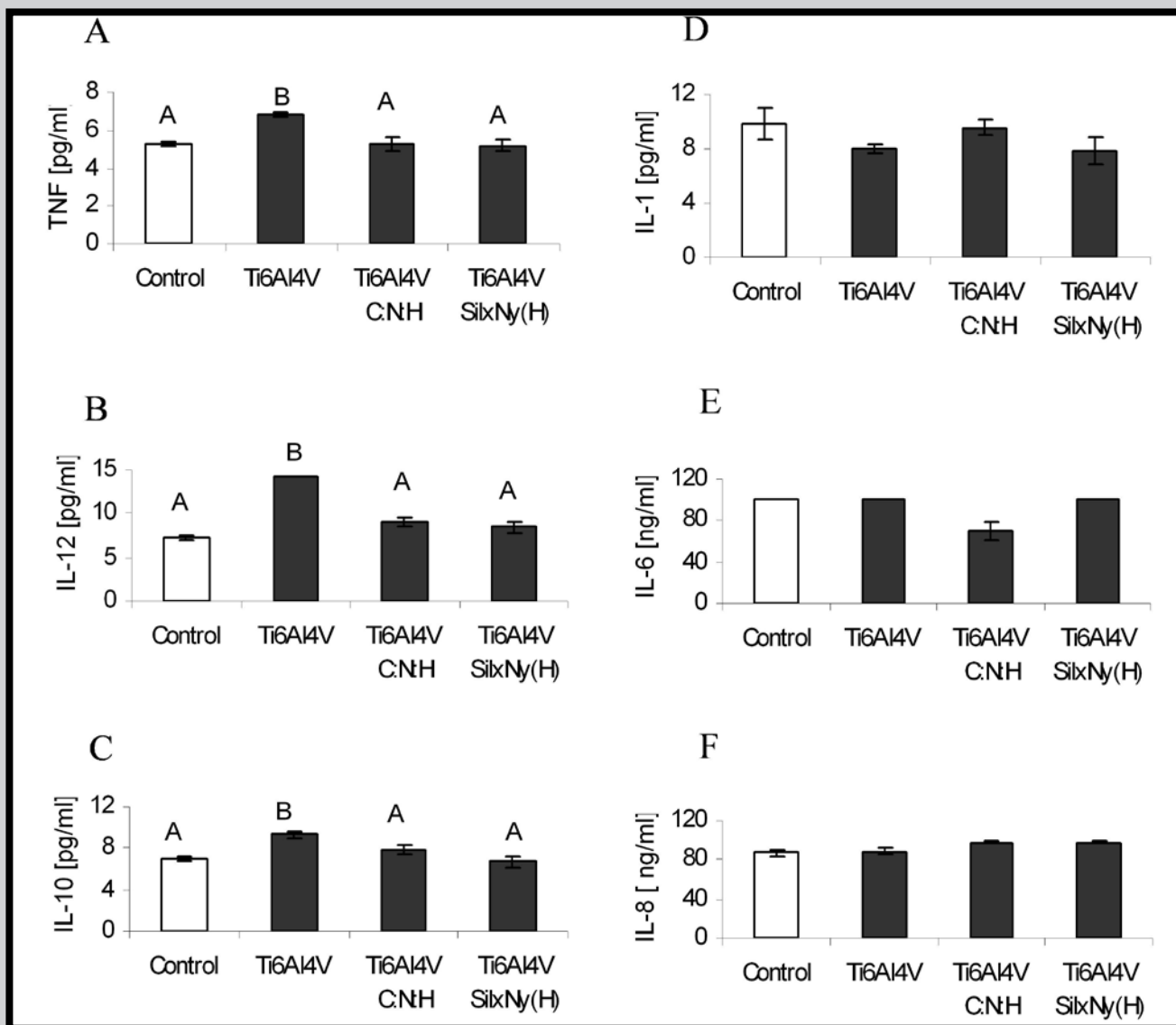
**FIG. 1.** The adherence of osteoblast-like MG-63 cells to TCPS (Control), Ti-alloy (Ti-6AL-4V) and modified Ti-alloy (Ti-6Al-4V C:N:H, Ti-6Al-4V-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H)) surfaces at 7 day of culture. O.D.- the optical density measured at 570nm. Letters (A, B, C) indicate values significant when tested against the control by means of the T-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

### Statistical analysis

At each time point four replicates were tested for the experimental and control samples, and four measurements on each sample were performed. The results were reported as mean values plus or minus the standard error (SEM). Statistical analyses were performed using the T-Tukey's test. The statistical significance of differences was set at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

Cell adhesion to synthetic surfaces is involved in a variety of phenomena, such as immune response, wound healing, and tissue integration of biomaterials. Cellular attachment, adhesion and spreading belong to the first phase of cell/material interactions, and the success of this phase will influence proliferation and differentiation of cells on biomaterial surfaces. In the case of materials for bone tissue regeneration, they are expected to promote osteoblasts adhesion and proliferation. The efficiency of orthopedic or dental implants is achieved if a solid interface is established with complete attachment between the material's surface and the bone tissue [7].



**FIG. 2.** The cytokine levels measured in supernatants from above cells cultured in contact with TCPS (Control), Ti-alloy, and Ti-alloy covered with a-C:N:H or a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layers. Letters (A, B) indicate values significant when tested against the control by means of the T-Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Results of our study showed better ability to promote cell adhesion of titanium alloy modified with a-C:N:H or a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) layers compared to unmodified titanium alloy. Though all the three materials evoked lower adherence of osteoblast-like cells compared to the control, it should be stressed that the coverings improved biological features of Ti-alloy. After 3 days of culture only the tendency was observed (data not shown) but after 7 days the a-C:N:H covering gave much better results than unmodified Ti-alloy surface (FIG. 1).

Interactions between materials and cells may influence the secretory response of the cells. The secretion of the pro-inflammatory and down regulating cytokines was examined in the supernatants collected from MG-63 cells cultures. Cytokines, used extensively in cellular communication, are critical to the development of the immune response. They are often secreted by cells that have encountered a pathogen, thereby activating and recruiting immune cells to increase the system's response [8].

In our experiment the level of cytokines secreted by MG-63 cells cultured on Ti-alloy disks for 3 days didn't show statistically significant differences (results not shown).

However, after 7 days the statistically significant increase in the level of pro-inflammatory TNF (FIG. 2A) and IL-12 (FIG. 2B), and anti-inflammatory IL-10 (FIG. 2C) produced by cells cultured on unmodified surface of titanium alloy was observed. On the contrary, the level of these cytokines secreted by cells cultured on a-C:N:H and a-SiC<sub>x</sub>N<sub>y</sub>(H) coatings didn't differ significantly compared to the control (FIG. 2). TNF is one of the most important cytokines initiating inflammation [9]. This cytokine initiates, among others, cascade reaction causing migration of inflammatory cells which function is destruction of a foreign body penetrating to the system. Another cytokine induced during inflammation is IL-12, which increases activity and proliferation of lymphocytes T, population of cells very effectively fighting pathogens [10]. The increase in secretion of above mentioned pro-inflammatory cytokines means that titanium alloy Ti-6AL-4V can as well evoke inflammatory reaction in *in vivo* conditions. Such reaction in the case of lack of infection would be harmful for the organism because could cause destruction of its own tissues. Confirmation, that increased secretion of some pro-inflammatory cytokines was to initiate inflammatory reaction, is increased production of pro-inflammatory cytokine IL-10. This cytokine is automatically secreted by cells to control the lowering of inflammatory reaction through inhibition of migration of lymphocytes destructing a foreign body [11]. Differences mentioned above, observed only after 7 days of cell culture and non observed after 3 days, point out the lack of acute intensive reaction. The lack of acute phase of inflammation seems to be beneficial, although it should be remembered that titanium alloy are placed in the tissue for period much longer than 1 week.

## Conclusion

Obtained results indicate that used surface modifications of titanium alloy appeared to be beneficial because they improved the adherence of osteoblast-like cells and didn't stimulate the production of cytokines inducing immune response. Application of coatings allows to maintain mechanical properties, high strength-to-weight ratio, and high corrosion resistance of titanium alloy and simultaneously improve its biocompatibility.

## Acknowledgements

The study was supported by research grant no. 215/KF/2007 in the Academy of Physical Education in Cracow.

## References

- [1] S. Błażewicz, L. Stoch. „Biomateriały”. W: „Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000”, red. M. Nałęcz, tom 4. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa, 2003.
- [2] J. Marciniak. „Biomateriały”. Wyd. Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2002.
- [3] T. Wierzchoń, E. Czarnowska, D. Krupa; „Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych”, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2004.
- [4] J.J.A.M. van Raay, P.M. Rozing et al. “Titanium in Medicine”, Springer – Verlag, Berlin, Heidenberg; 2001.
- [5] E. Broitman, W. Macdonald, N. Hellgren et al. Diamond and Related Materials, 2000, 9:1984 – 1991.
- [6] B. Płytycz, M. Chadzińska. Hodowla tkanek w immunologii. W: Hodowla komórek i tkanek (red. S.Stokłowska) Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 2004, 187-216.
- [7] J. Lorenzo, M Horowitz, Y. Choi. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. Endocr Rev, 2008, 29, 403-30.
- [8] R.J. Schutte, L. Xie, B. Klitzman, W.M. Reichert. In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. Biomaterials, 2008 Oct 10. [Epub ahead of print].
- [9] J. R. Bradley. TNF-mediated inflammatory disease. J Pathol, 2008, 214: 149-60.
- [10] C.L. Langrish, B.S. Mc Kenzie, N.J. Wilson, R. de Waal Malefyt, R.A. Kastelein, D.I. Cua. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. Immunol Rev, 2004, 202: 95-105.
- [11] M.O. Li, R.A. Flavell. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor – beta and interleukin 10. Immunity, 2008, 28: 468-76.