

WPŁYW WIELOKROTNEJ STERYLIZACJI NA WŁAŚCIWOŚCI BIOMATERIAŁÓW

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

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

Streszczenie

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

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

[Inżynieria Biomateriałów 136 (2016) 11-20]

INFLUENCE OF THE MULTIPLE STERILIZATION PROCESS ON THE BIOMATERIAL PROPERTIES

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materiały i metody

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

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

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

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

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

γ_L - swobodna energia powierzchniowa cieczy pomiarowej

γ_S - swobodna energia powierzchniowa badanego materiału

$\gamma_L^d + \gamma_L^p$ - składowa dyspersyjna i polarna swobodnej energii powierzchniowej cieczy

$\gamma_S^d + \gamma_S^p$ - składowa dyspersyjna i polarna swobodnej energii powierzchniowej badanego materiału

θ - kąt zwilżania

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

Materials and Methods

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

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

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

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

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

γ_L - surface free energy of liquid

γ_S - surface free energy of the solid

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

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

θ - contact angle on the liquid/solid boundary

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

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

Wyniki i dyskusja

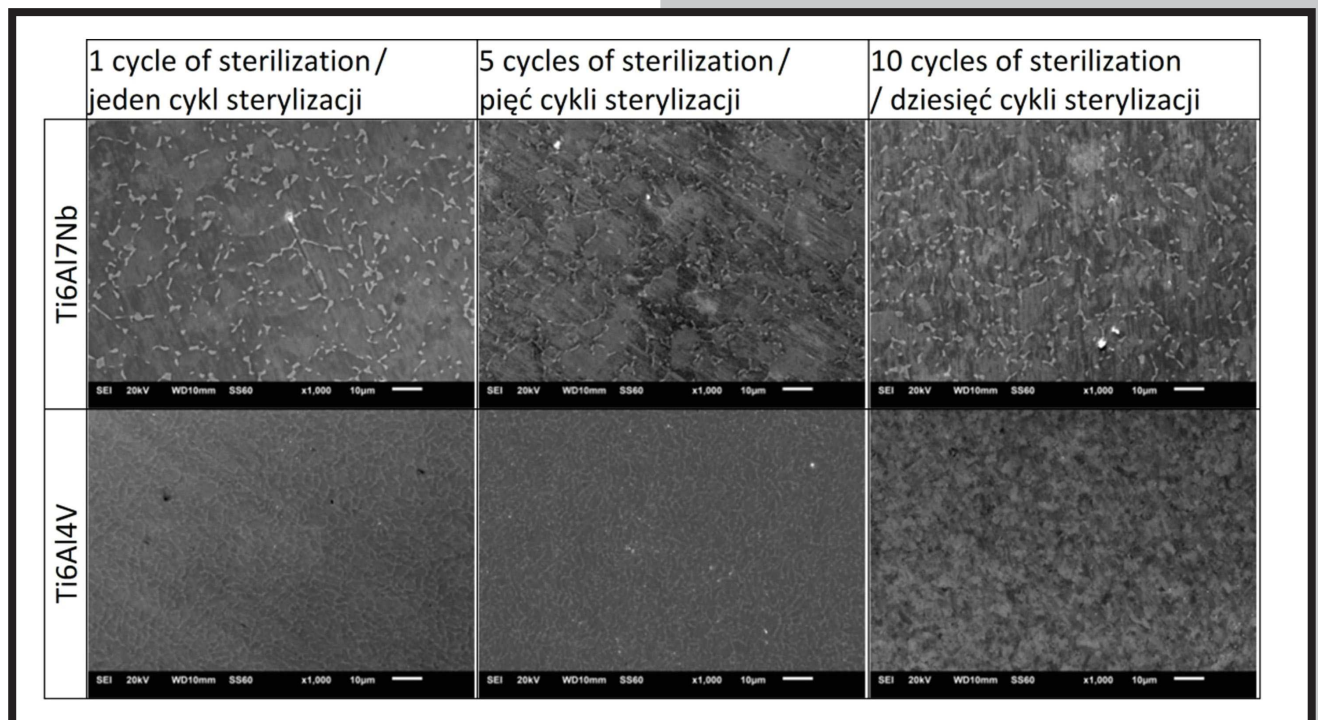
Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu wielokrotnej sterylizacji na zmianę parametrów powierzchni dwóch stopów tytanu: Ti6Al7Nb i Ti6Al4V. Na zdjęciach SEM (RYS. 1) można zaobserwować wzrost chropowatości powierzchni próbek, co zostało potwierdzone przez późniejsze badanie chropowatości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

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

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

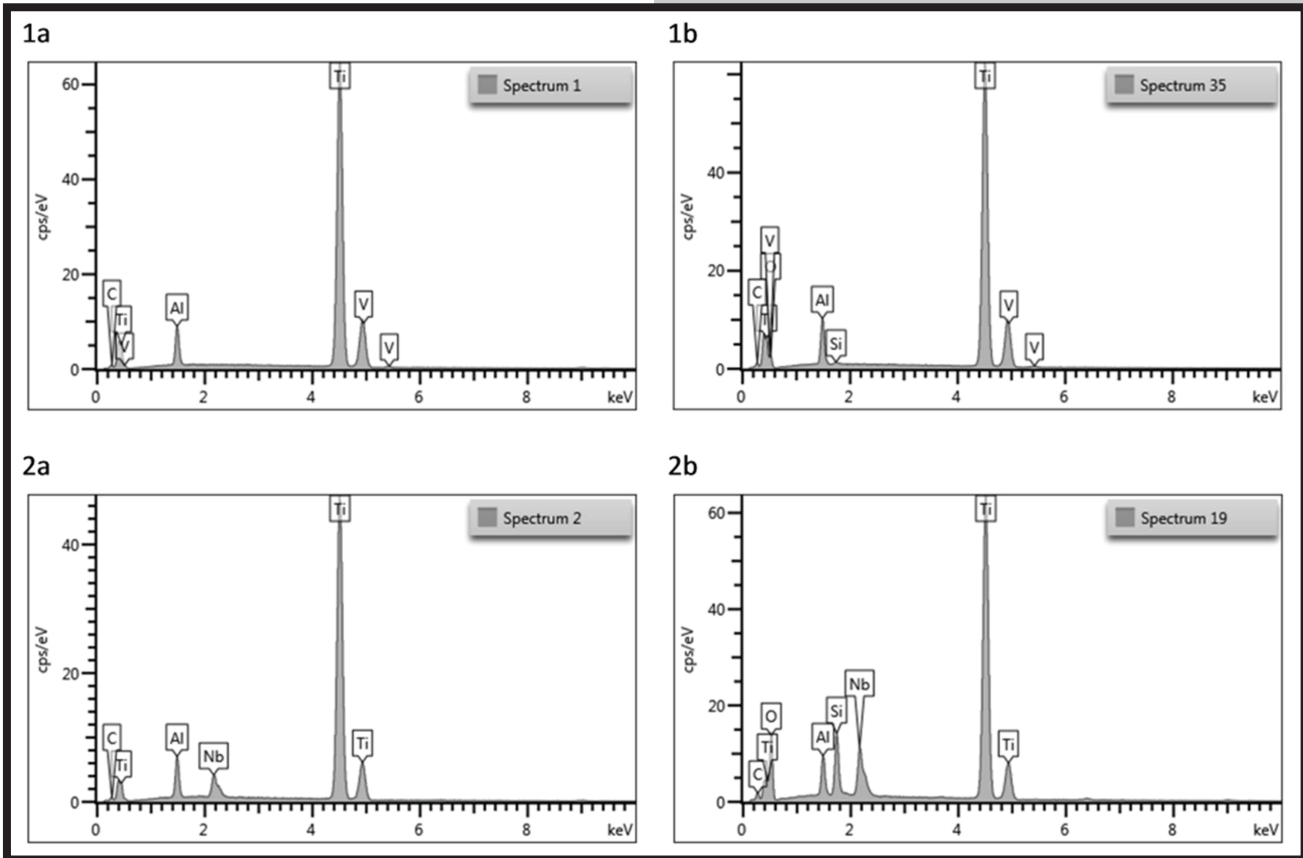
Results and Discussion

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

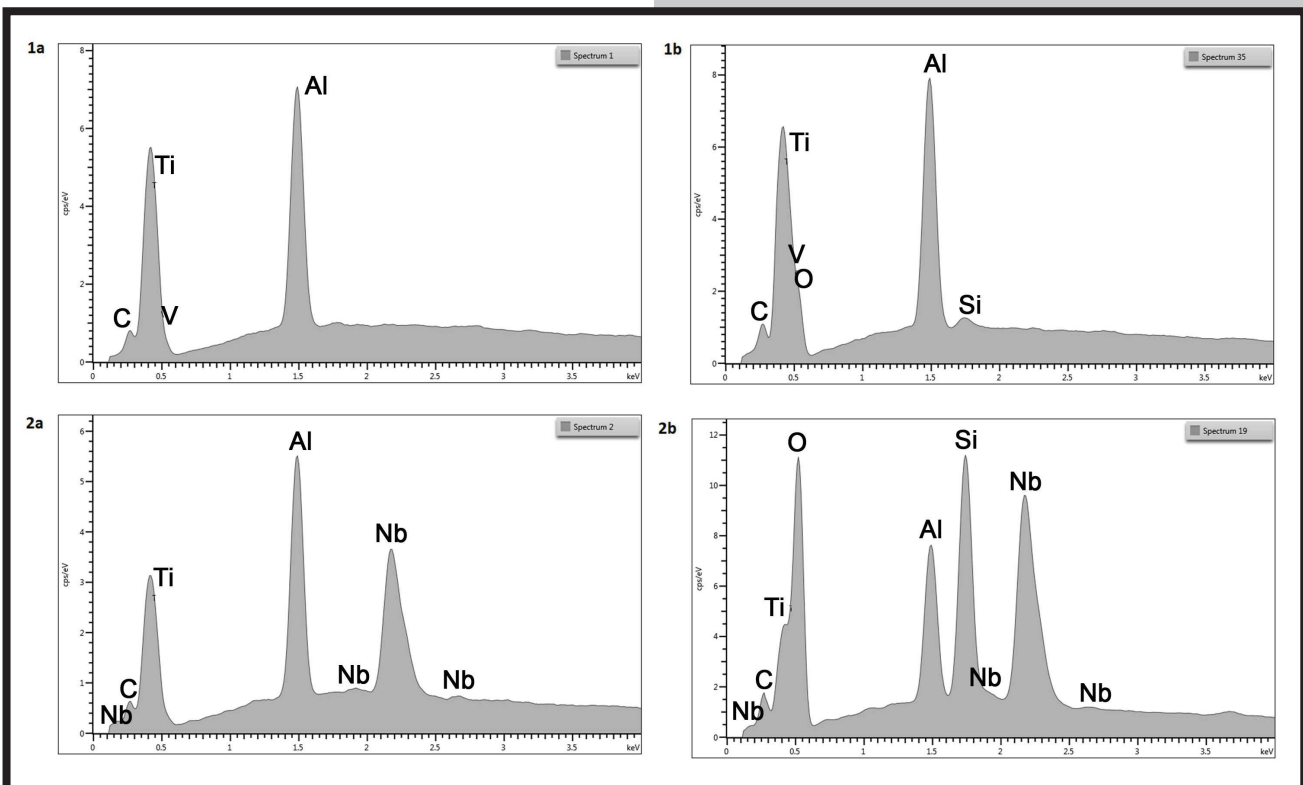


RYS. 1. Zdjęcia SEM próbek Ti6Al7Nb i Ti6Al4V po jednym, pięciu i dziesięciu cyklach sterylizacji przy 1000x powiększeniu.

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



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



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

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

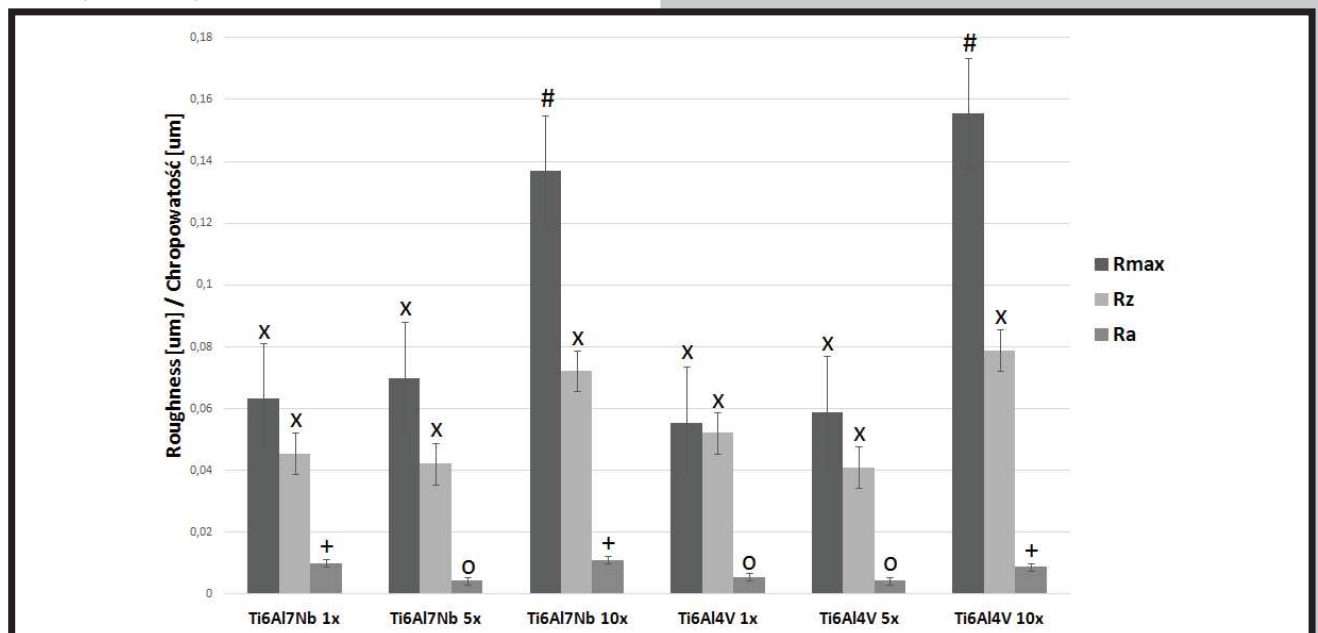
Analiza EDS ujawniła również zmiany w składzie chemicznym powierzchni. Zwiększona intensywność pików pochodzących od tlenu wskazuje, że grubość warstwy tlenkowej jest zwiększona (RYS. 3).

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

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

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

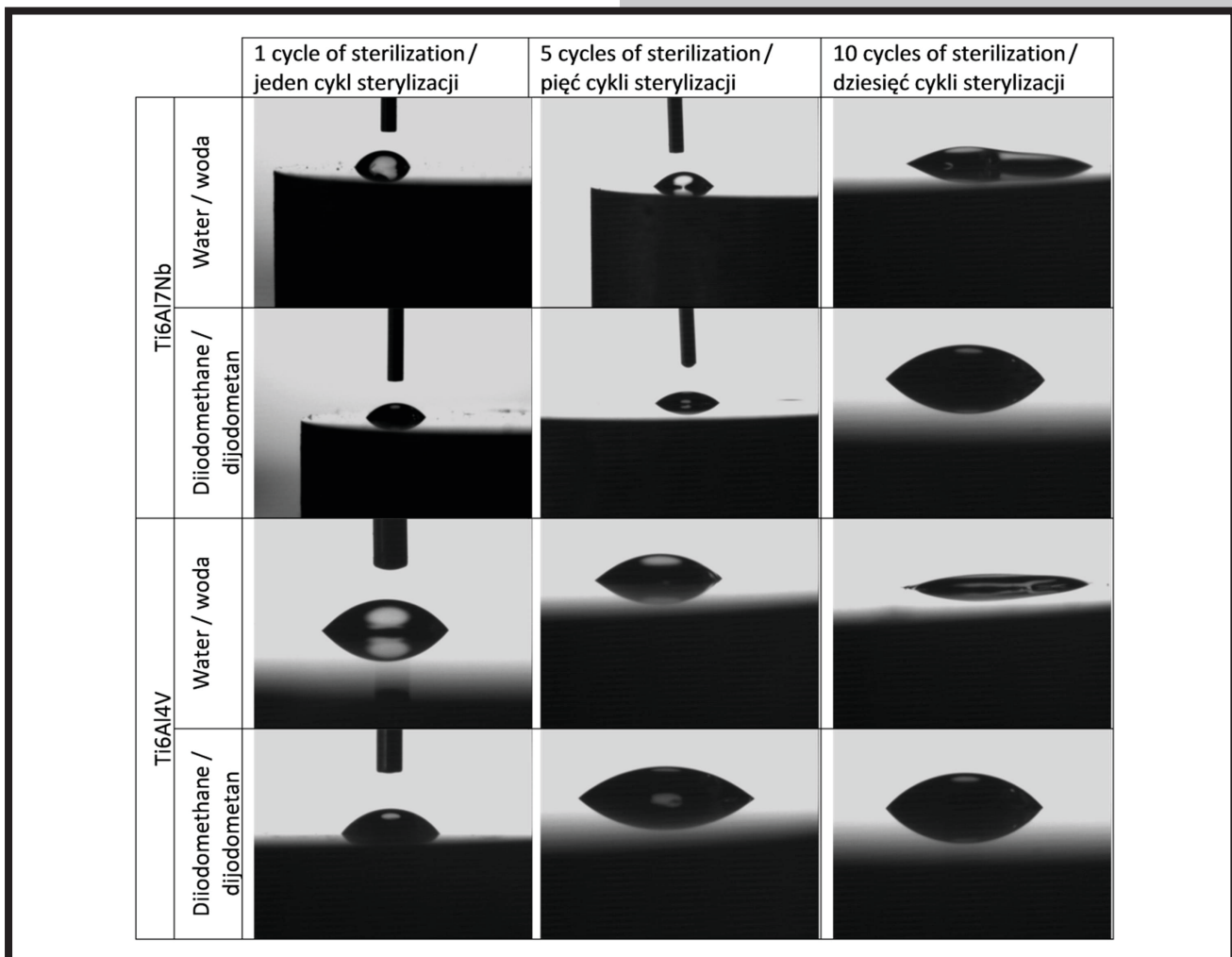
Following surface roughness parameters obtained during the profilometer measurements were taken into consideration: Rmax (maximum), Rz (peak-to-valley) and Ra (average). Although, no significant change in Ra parameter was observed, the value of Rmax increased noticeably for the samples exposed to the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



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

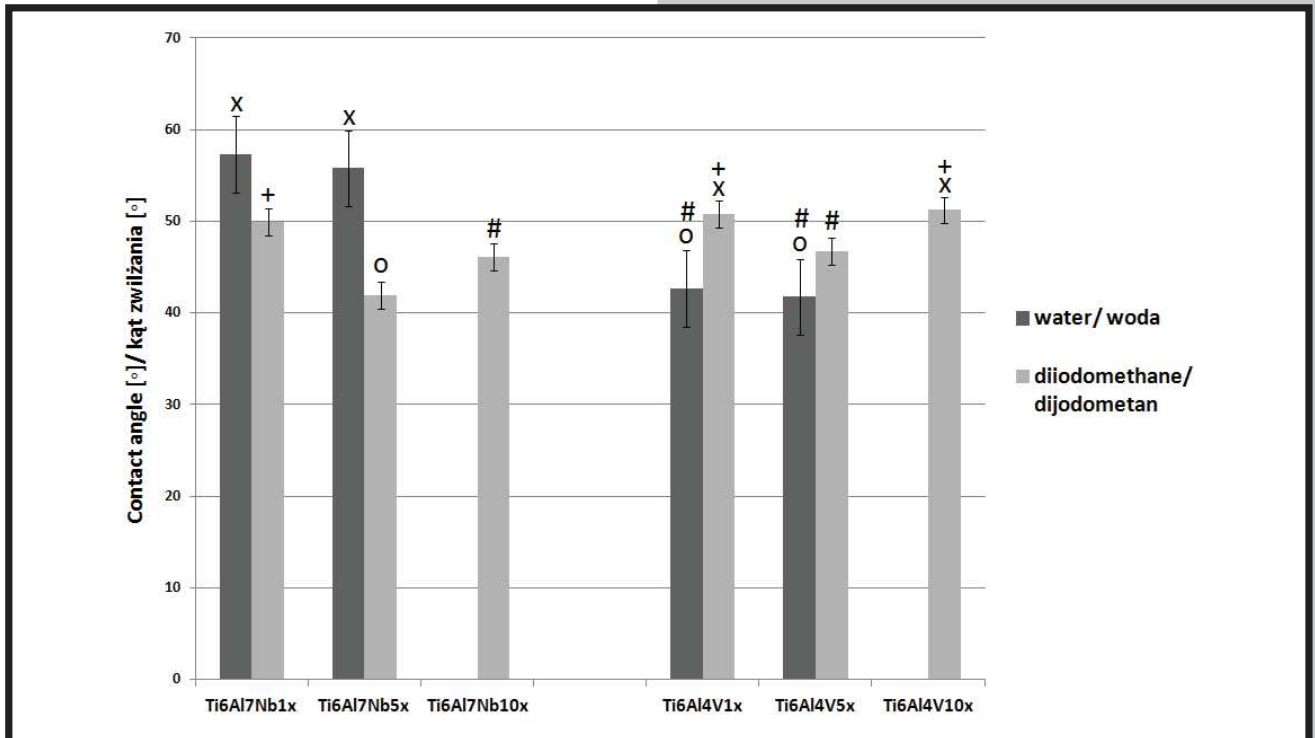
Analiza kątów zwilżania próbek Ti6Al7Nb i Ti6Al4V wskazuje na istotną zmianę zwilżalności powierzchni po wielokrotnej sterylizacji. Wraz ze zwiększeniem liczby cykli sterylizacji odnotowano zwiększenie wartości energii powierzchniowej próbek. Po jednym cyklu w autoklawie średnie wartości kąta zwilżania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

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



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

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



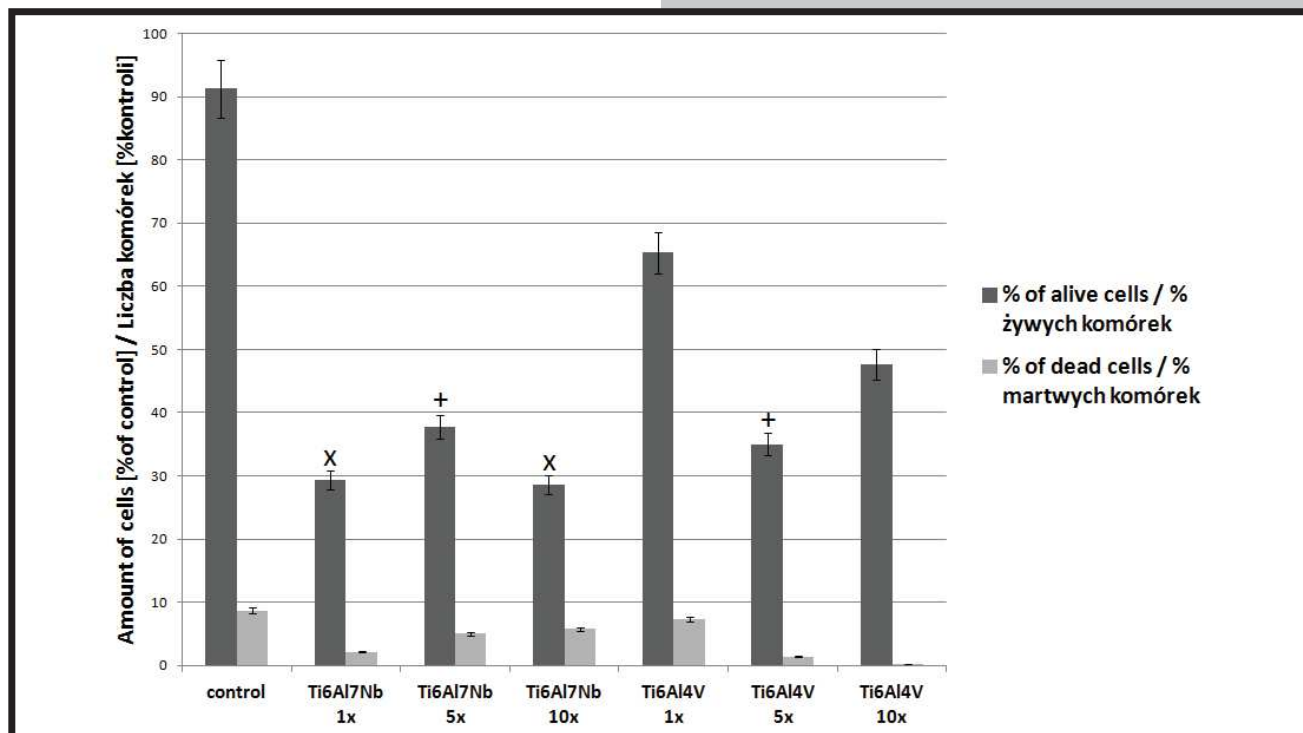
RYS. 6. Wartości kątów zwilżania wody i diiodometanu dla próbek po jednym, pięciu, i dziesięciu cyklach sterylizacji. Symbolami oznaczono wyniki, w których występuje brak różnic znamiennej statystycznie.
 FIG. 6. Values of contact angle for water and diiodomethane for samples after 1, 5 and 10 sterilization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

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

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

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

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



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

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

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

Wnioski

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

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

Conclusion

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

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

Podziękowania

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

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

Acknowledgements

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

Piśmiennictwo

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

References

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