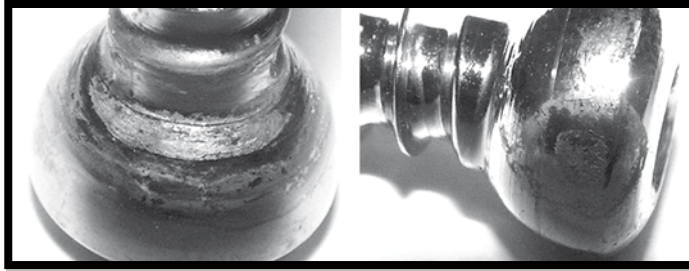


Wykonano zdjęcia mikroskopowe (elektronowy mikroskop skaningowy Philips XL 30) pokazujące zniszczenia korozyjne (RYS. 3).

Podsumowanie

Przyczyną wcześniejszego usunięcia śrub z organizmu była infekcja. Najprawdopodobniej spowodowana korozją na styku implant-kość. Na styku tym zaczęły gromadzić się produkty korozji, po usunięciu których zaobserwowano głębokie wżery.



RYS. 3. Zniszczenia korozyjne na powierzchniach śrub.
FIG. 3. The corrosion failure on the screws surface.

Some microscope photographs (Environmental Electron Scanning Microscope Philips XL 30) were taken to show corrosion destruction (FIG. 3).

Summary

The reason for earlier removal of the screw was inflammation. Most probably caused by the corrosion on the bone-implant contact.

In that place there appeared the corrosion products, after removing them corrosion pits were clearly visible.

Piśmiennictwo

- [1] Wierchoń T., Czarnowska E., Krupa D.: Inżynieria powierzchni w wytwarzaniu biomateriałów tytanowych. Oficjalne Wydawnictwo Politechniki Warszawskiej. Warszawa 2004.
[2] Kamach Mudali U., Sridhar T.M., Raj B.: Corrosion of Bioimplants. Sadhana vol.28, parts 3&4, June/August 2003, pp. 601-637.

References

- [3] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej. Gliwice 2002.
[4] Łaskawiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej. Gliwice 2002.
[5] Enderle J., Blanchard S., Bronzino J.: Introduction to Biomedical Engineering". Academic Press 1999.

WPŁYW FOTOUTLENIEŃIA POWIERZCHNI FILMÓW POLI(METAKRYLANU METYLU) NA ICH BIODOPATYBILNOŚĆ

HANNA CHABERSKA^{1,2}, JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{2*}, MARTA POKRYWCZYŃSKA³, ALINA SIONKOWSKA²

¹ UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, COLLEGIUM MEDICUM, WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, KATEDRA I ZAKŁAD BROMATOLOGII, UL. JAGIELLOŃSKA 13, 85-067 BYDGOSZCZ, POLSKA

² UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, WYDZIAŁ CHEMII, KATEDRA CHEMII I FOTOCHEMII POLIMERÓW, UL. GAGARINA 7, 87-100 TORUŃ, POLSKA

³ UNIWERSYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA, COLLEGIUM MEDICUM, KATEDRA BIOLOGII MEDYCZNEJ, UL. KARŁOWICZA 13, 85-092 BYDGOSZCZ, POLSKA

* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 77-80, (2008), 93-95]

Wstęp

Fibroblasty z linii komórkowej 3T3 są powszechnie używane do określania biokompatybilności materiałów stosowanych w badaniach biomedycznych oraz inżynierii tkankowej. Modyfikowanie fizyczne polimerów, np. promieniowaniem UV, może w znaczący sposób zmieniać oddziaływanie materiału biologicznego z powierzchnią polimerową. Proces ten uzależniony jest zarówno od zmian strukturalnych (chropowatości) jak i chemicznych (zmiana stężenia grup zawierających atomy tlenu w warstwie wierzchniej, wzrost hydrofilowości powierzchni).

INFLUENCE OF PHOTO-OXIDATION OF SURFACE POLI(METHYL METHACRYLATE) FILMS ON ITS BIODOPATYBILITY

HANNA CHABERSKA^{1,2}, JOANNA SKOPIŃSKA-WIŚNIEWSKA^{2*}, MARTA POKRYWCZYŃSKA³, ALINA SIONKOWSKA²

¹ NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF BROMATOLOGY, 13, JAGIELLOŃSKA STR., 85-067 BYDGOSZCZ, POLAND

² NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, FACULTY OF CHEMISTRY, DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND PHOTOCHEMISTRY OF POLYMERS, 7, GAGARINA STR., 87-100 TORUŃ, POLAND

³ NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, THE CHAIR OF MEDICAL BIOLOGY, 13, KARŁOWICZA STR., 85-092 BYDGOSZCZ, POLAND

* E-MAIL: JOANNA@CHEM.UNI.TORUN.PL

[Engineering of Biomaterials, 77-80, (2008), 93-95]

Introduction

The 3T3 fibroblasts cell line are commonly used to qualification biocompatibility of materials in biomedical investigations as well as tissue engineering. The physical modification of polymers, for example by the UV-irradiation, can significantly influence on interaction between the polymer surface and biological material. This process is dependent on structural (the roughness) and chemical changes (the change of concentration of groups including the oxygen atoms in the surface layer, the increase hydrophilicity of the surface).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wpływu zmian fotochemicznych, inicjowanych, monochromatycznym promieniowaniem UV, na oddziaływanie fibroblastów z powierzchnią filmów poli(metakrylanu metylu) PMMA, otrzymanych metodą wylewania z roztworów polimerowych przygotowanych w różnych rozpuszczalnikach.

Część eksperymentalna

Materiały

Przedmiotem badań jest poli(metakrylan metylu) (PMMA, Aldrich, Niemcy). 2% roztwór polimeru przygotowano w następujących rozpuszczalnikach: chloroform-CF, chlorobenzen-CB, toluen-TOL i tetrahydrofuran -THF (czysto, POCh, Polska). Cienkie błony polimerowe uzyskano przez wylewanie roztworu polimerowego na podłoże szklane borokrzemowe (Medlab, Polska) i odparowanie rozpuszczalnika. Próbki suszono w próżni do stałej masy. Grubość otrzymanych filmów wynosiła ok. 30µm (Ultramet A-91, INCO, Polska).

Warunki napromieniania

Filmy PMMA napromieniano w atmosferze powietrza, w temperaturze pokojowej, stosując niskociśnieniową lampę rtęciową TUV30W (Philips, Holandia) o długości fali 254 nm. Natężenie promieniowania padającego, zmierzone elektronicznym radiometrem (IL1400, International Light, USA), wynosiło 3,2mW/cm². Czas napromieniania ustalono na 8 godzin.

Badania

ATR-IR

Zmiany fotochemiczne na powierzchni filmów polimerowych analizowano na podstawie widm absorpcyjnych, w zakresie 4000-650cm⁻¹, otrzymanych przy użyciu spektrofotometru Genesis II firmy Mattson z przystawką do ATR firmy Pike Technology wyposażoną w kryształ ZeSe. Do opracowania wyników zastosowano program WinFirst z korekcją ATR-IR. Analizowano intensywność integralną wybranych pasm absorpcyjnych: grup hydroksylowych (3600-3000cm⁻¹) i karbonylowych (max. 1724cm⁻¹).

Badanie powinowactwa fibroblastów z linii komórkowej 3T3

Powinowactwo komórek 3T3 badano, in vitro, w medium złożonym z DMEM z 10% dodatkiem FBS i antybiotyków. Roztwór zawierający komórki w ilości 1x10⁴ w 20 µl nanoszono na powierzchnię filmów PMMA, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C (±1°) w atmosferze zawierającej 5% dwutlenku węgla przez 1h. Aby określić powinowactwo komórek do otrzymanych błon, wykonano zdjęcia przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse TS 100 firmy Nikon (Japonia). Na podstawie zdjęć zliczono żywe (niewybarwione błękitem trypanu) komórki na powierzchni polimerowej przed i po naświetleniu (8h) promieniowaniem UV. Dla każdej powierzchni wykonano trzy niezależne analizy.

The aim of this work is the presentation of influence of photochemical changes, induced by the monochromatic UV-irradiation, on interaction between surface of poly(methyl methacrylate) PMMA films received by casting of the polymer solutions in the different solvents with the fibroblasts.

Experimental

Materials

The poly(methyl methacrylate) (PMMA, Aldrich, Germany) is the object of researches. The 2% solution of polymer was prepared in following solvents: chloroform-CF, chlorobenzene-CB, toluene-TOL and tetrahydrofuran-THF (analytically pure, POCh, Poland). The thin polymer films were obtained by casting the solutions on the borosilica glass supports (Medlab, Poland) and evaporation the solvents. The samples were dried in vacuum to stable mass. The thickness of received films were ca. 30 µm (Ultramet A-91, INCO, Poland).

UV-irradiation

The PMMA films were irradiated in air atmosphere at room temperature. The low-pressure mercury lamp TUV30W (Philips, Holland) about wavelength 254 nm was used. The intensity of incident radiation, measured with electronic radiometer (IL1400, International Light, USA), was 3,2mW/cm². The time of irradiation was established on 8 hours.

Researches

ATR-IR

The photochemical changes on the surface of polymer films were analyzed by infrared spectroscopy. The absorption spectra were collected in range 4000-650cm⁻¹ using spectrophotometer Genesis II firm Mattson with ATR accessory (Pike Technology) equipped in ZeSe crystal. The program to study of results was WinFirst with ATR-IR correction. The integral intensity of chosen absorptive bands (hydroxyl (3600-3000cm⁻¹) and carbonyl groups (max. 1724cm⁻¹)) was analyzed.

Affinity of the fibroblasts with line cellular 3T3

The affinity of the 3T3cells, was studied in vitro, in medium consisted of DMEM with 10% addition the FBS and the antibiotics. The solution including the cells in quantity 1x10⁴ in 20µl was placed on surface of the PMMA films, and then incubated in temperature 37°C (±1°) in atmosphere containing 5% carbon dioxide by 1h. In order to qualify affinity the cells to the polymer films, photos was taken by using fluorescent microscope Nikon Eclipse TS 100, firm Nikon (Japan). The living cells (no-coloured by trypan blue) on the polymer surface, before and after UV-irradiation (8h), were counted. For the every surface three independent analyses was executed.

TABELA 1. Intensywność integralna pasm grup hydroksylowych POH i karbonylowych PC=O przed i po 8-godzinny naświetlaniu, udział tych ugrupowań Δ na powierzchni filmów PMMA oraz liczba żywych osadzonych komórek 3T3.

TABLE 1. The integral intensity of the hydroxyl POH and carbonyl PC=O groups before and after 8-hourlong UV-irradiation, part these groups Δ on surface the PMMA films as well as number of the 3T3 living cells.

Rozpuszczalnik użyty do przygotowania roztworu Solvent used for preparation of polymer solution	Czas naświetlania promieniowaniem UV Time of UV irradiation [h]	P _{OH}	P _{C=O}	Δ	3T3/0,05mm ²
CF	0	0	8,41	-	0
	8	2,75	9,29	0,33	10
CB	0	0	9,43	-	0
	8	2,78	10,52	0,32	7
TOL	0	0	9,98	-	0
	8	5,61	8,41	0,21	5
THF	0	0	8,31	-	9
	8	6,04	9,39	0,15	2

Wyniki i ich dyskusja

TABELA 1 pozwala przeanalizować udział grup hydroksylowych i karbonylowych na powierzchni poli(metakrylanu metylu) oraz powinowactwo komórek 3T3 do błon PMMA, otrzymanych z różnych rozpuszczalników, przed i po ich napromienieniu.

Stwierdzono korelację między zawartością grup hydroksylowych i karbonylowych, na powierzchni naświetlonych filmów polimerowych, a powinowactwem fibroblastów.

Aby przedstawić wpływ zawartości grup karbonylowych i hydroksylowych na powinowactwo komórek 3T3 do naświetlonej powierzchni polimeru wprowadzono następującą zależność empiryczną:

$$\Delta = (P_{C=O,0h} / P_{C=O,8h}) / P_{OH,8h}$$

gdzie: Δ - udział względny ugrupowań karbonylowych do ugrupowań hydroksylowych na powierzchni PMMA, $P_{C=O,0h}$ - intensywność integralna pasma karbonylowego PMMA nienaświetlonego, $P_{C=O,8h}$, $P_{OH,8h}$ - intensywność integralna, odpowiednio, pasma karbonylowego i hydroksylowego PMMA po 8-godzinnym naświetleniu.

Brak powinowactwa fibroblastów do nienaświetlonej powierzchni PMMA, z wyjątkiem błon otrzymanych z roztworu THF, może być spowodowany obecnością estrowych grup bocznych. Duże powinowactwo do błon otrzymanych z roztworu zawierającego THF można przypisać obecności rodników nadtlenkowych, powstających w trakcie tworzenia się filmu polimerowego.

Ośmiogodzinne napromienienie wpłynęło na ogół na wzrost powinowactwa komórek 3T3 do błon PMMA. Zaobserwowano zróżnicowanie, w ilości osadzonych żywych komórek fibroblastów, w zależności od rodzaju rozpuszczalnika użytego do otrzymania polimerowego filmu. Jedynie w przypadku błon otrzymanych z roztworu THF napromienienie wpłynęło na zmniejszenie powinowactwa materiału biologicznego do filmu polimerowego, w wyniku jego degradacji fotochemicznej. W przypadku naświetlonych błon PMMA decydujący wpływ na proliferację osadzonych komórek 3T3 ma degradacja ugrupowań estrowych, tworzenie ugrupowań aldehydowych, ketonowych i hydroksylowych (prawdopodobnie śladowe ilości rozpuszczalnika wpływają na różną ich zawartość na naświetlonej powierzchni polimeru). Jednak zbyt wysoki udział grup hydroksylowych na powierzchni PMMA, powstających w wyniku działania ultrafioletu, wpływa niekorzystnie na powinowactwo fibroblastów 3T3 do badanej powierzchni. Zatem spośród przebadanych filmów polimerowych, najkorzystniejsze warunki do rozwoju fibroblastów stwarzają błony, otrzymane z roztworu polimeru w chloroformie i chlorobenzenie, napromieniane 8 godzin.

Podsumowanie

1. Promieniowanie UV powoduje zmiany fotochemiczne wpływające na polepszenie biokompatybilności badanych błon z wyjątkiem otrzymanych z roztworu zawierającego THF.
2. Rozpuszczalnik użyty do przygotowania błon polimerowych wpływa na zróżnicowanie chemiczne powierzchni polimeru po 8-godzinnym naświetlaniu (UV; $\lambda = 254$ nm).
3. Przez zmianę zawartości grup hydroksylowych oraz karbonylowych na polimerowej powierzchni można wpływać na zróżnicowanie powinowactwa fibroblastów do PMMA.
4. Przedstawione wyniki sugerują, że można sterować procesem tworzenia się zrostów pooperacyjnych przez zastosowanie PMMA modyfikowanego promieniowaniem UV.

Results and discussion

TABLE 1 affords to analyze the concentration the hydroxyl and the carbonyl groups on the poly(methyl methacrylate) surface as well as the affinity of 3T3 cells to the PMMA films received from different solvents before and after UV-irradiation.

The correlation between content of hydroxyl and carbonyl groups after UV-irradiation the polymer films and the affinity of fibroblasts to PMMA was affirmed.

The influence of the carbonyl and the hydroxyl groups content on affinity of the 3T3 cells to the irradiated polymer surface was described by the following empirical equation:

$$\Delta = (P_{C=O,0h} / P_{C=O,8h}) / P_{OH,8h}$$

where: Δ - the relative participation the carbonyl and the hydroxyl groups on surface the PMMA, $P_{C=O,0h}$ - the integral intensity of the carbonyl band the nonirradiation PMMA, $P_{C=O,8h}$, $P_{OH,8h}$ - integral intensity of carbonyl and hydroxyl bands the PMMA after 8 - hourlong irradiating, respectively.

There were observed no fibroblasts affinity to the nonirradiated PMMA surface with except of the films obtained from THF solution. It could be caused by the presence of the esters groups. Affinity the 3T3 cells to the films received from solvent including THF could be result the presence of peroxide radicals, coming during creating of the polymer film.

Eight hours - irradiation improve on affinity of the 3T3 cells to PMMA films. The differentiation in quantity of the living fibroblast cells place on surface in dependence from of solvent used to obtaining of polymer film was observed. In case of films received from THF solution the decrease of affinity of biological material to the surface as a result of photochemical degradation was showed.

In case of the irradiated PMMA films the proliferation of the 3T3 cells is depended on the degradation of ester groups as well as the creating of the aldehyde, ketone and hydroxyl groups. However the so high participation of hydroxyl groups on the PMMA surface, created as a result of UV-irradiation, decrease the affinity of the fibroblasts 3T3 to researched surface. The results of our experiments let us to conclude that the best conditions to development fibroblasts (from among given an examination polymer films) create the films received from chloroform and chlorobenzene solution after the 8 hours irradiating.

Summary

1. UV-irradiation causes photochemical changes which improves biocompatibility of investigated films (the exception is the film obtained by evaporating of THF).
2. The solvent used to preparation of polymer films influences on chemical differentiation the surface of polymer after 8 - hours of irradiation (UV; $\lambda = 254$ nm).
3. The affinity of the fibroblasts to PMMA surface could be changed by the creation of the hydroxyl and carbonyl groups on polymer surface during UV irradiation.
4. These results suggest that it could be possible to control the process of creating the surgical adhesion by use of the UV-irradiated PMMA.