

Anna DONESZ¹, Justyna KRZAK-ROŚ², Iwona KOCHANOWSKA³, Romuald BĘDZIŃSKI⁴, Zakład Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej, Politechnika Wrocławska, Wrocław

THE STRUCTURE OPTIMIZATION OF IMPLANTS MATERIALS OF THE SURFACE LAYERS BY SOL-GEL COATING

Streszczenie. This work presents the synthesis of fluorine- and chlorine-doped silica thin films on stainless steel (316L) prepared by the sol-gel method. Obtained materials were examined: structurally (SEM, roughness measurements), mechanically (four-point bending test) and biologically (in vitro). The results of the tests show that it is a possibility to synthesis by sol-gel method stable, continuous and biocompatible coating for materials used for implants.

1. WSTĘP

W związku z rozwojem nowych możliwości implantacji, nadal otwarty jest problem warstw wierzchnich na implanty. Wynika to z faktu, iż wszystkie biomateriały metaliczne zawierają w sobie toksyczne pierwiastki. Z tego powodu podjęto badania nad zastosowaniem warstw zol-żelowych w różnych kombinacjach technologicznych aby uzyskać możliwie optymalną warstwę ochronną.

Celem pracy jest opracowanie powtarzalnych i stabilnych warstw wierzchnich zapewniających biofunkcjonalność, a także stanowiących barierę dyfuzyjną do zastosowania na implanty krótkoterminowe. W pracy wybrano podłoże ze stali austenitycznej 316L w postaci prostopadłościennych próbek i krążków, które pokryto metodą zol-żel warstwami krzemionkowymi (SiO₂) z domieszką chloru i fluoru.

2. MATERIAŁY I METODY

Do badań użyto implantacyjne podłoże metaliczne ze stali austenitycznej 316L w postaci próbek: prostopadłościennych płytek o wymiarach 50mm×10mm×1mm, oraz krążków o promieniu R=6,5mm. Próbki pokryto metodą zol-żel powłokami krzemionkowymi domieszkowanymi fluorem (SiO₂+F) oraz chlorem (SiO₂+Cl). Metoda ta polega na przygotowaniu zolu- roztworu koloidalnego prekursora i przeprowadzeniu go w żel. Reakcja ta prowadzona jest głównie w roztworach alkoholowych lub/i wodnych.

Do syntezy powłok krzemionkowych użyto dwóch różnych prekursorów krzemowych: tetraetoksylan (TEOS) i tetrametoksylan (TMOS), dwóch domieszek: fluorotrietoksylan (FTEOS) i 3-chloropropyltrimetoksylan (CIPtMOS), rozpuszczalnik-etanol (EtOH) i katalizator kwas solny (HCl_{aq}). Z wymienionych substratów sporządzono dwa różne (inne

¹ Studentka V roku Inżynierii Biomedycznej na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki,

² Instytut Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej Politechniki Wrocławskiej,

³ Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu,

⁴ Zakład Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej Politechniki Wrocławskiej.

prekursor krzemowy, inna domieszka) hydrolizaty krzemionkowe mieszając je na mieszadle magnetycznym w następujących stosunkach objętościowych [ml]:

- TEOS:EtOH=9:1:20,
- TMOS:CIPTMOS EtOH=7:3:20 + 1 kropla HCl_{aq}.

Hydrolizaty nakładano metodą zanurzeniową (dip coating), która polega na zanurzeniu podłoża w roztworze z kontrolowaną prędkością zanurzania i wyciągania próbki. Proces nakładania powłoki powtórzono trzykrotnie, co 24h w wyniku otrzymując powłokę trójwarstwową. Przygotowane próbki (podłoże + powłoka) pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu

w temperaturze pokojowej przez 48h, a następnie otrzymane materiały wygrzewano w temperaturach 300°C, 500°C, oraz wysuszono w 50°C.

Otrzymane materiały poddano badaniom strukturalnym (SEM, profilografometria), mechanicznym (próba czteropunktowego zginania) oraz biologicznym (hodowle in vitro).

Mikrostrukturę powłok krzemionkowych zbadano skaningowym mikroskopem elektronowym firmy JEOL JSM-5800LV Skaning w Instytucie Technologii Maszyn i Automatykacji Politechniki Wrocławskiej stosując powiększenie 500x i 3000x. W trakcie badań stosowano napięcie przyspieszające rzędu 15÷20kV. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) umożliwiła mikroskopową analizę morfologii powierzchni, oraz ocenę adhezji warstw do podłoża.

Badania chropowatości powierzchni prostopadłościennych próbek metalicznych zarówno z powłokami krzemionkowymi jak i czystego podłoża (stal 316L) przeprowadzono za pomocą profilografometru RORM TALYSURF 120L firmy RANK TAYLOR HOBSON LIMITED w Instytucie Technologii Maszyn i Automatykacji Politechniki Wrocławskiej. Pomiar przeprowadzono metodą stykową, stosując stożkową igłę pomiarową wykonaną z diamentu o promieniu zaokrąglenia wierzchołka 2 μm oraz kącie rozwarcia 90°. Przyjęto odcinek pomiarowy o długości $l_m=6\text{mm}$, który w trakcie analizy zmierzonych profili i obliczeń parametrów chropowatości został podzielony na odcinki elementarne o długości $l_r=0,8\text{mm}$. W profilografometrii zmierzono i wyznaczono parametry chropowatości powierzchni podłoża ze stali 316L z naniesionymi powłokami.

Próbie czteropunktowego zginania przeprowadzono na maszynie wytrzymałościowej MTS Mini Bionix 858 w Zakładzie Inżynierii Biomedycznej i Mechaniki Eksperymentalnej Politechniki Wrocławskiej. W teście tym badano reakcję powłok SiO₂ na podłożu metalicznym (stal 316L) na działanie cyklicznych obciążeń zmiennych. Próbki obciążane były cykliczną siłą z częstotliwością 1Hz przez 100 cykli. Analiza wyników polegała na obserwacji za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) powierzchni powłok zarówno przed jak i po przeprowadzonych testach. Szczególną uwagę skierowano na obserwację czy i w jakim stopniu zmienia się ciągłość powłoki na podłożu metalicznym po wykonanych testach czteropunktowego zginania.

Badania komórkowe przeprowadzono w Laboratorium Immunologii Zakładu Terapii Doświadczalnej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Zastosowano technikę hodowli tkankowej, prowadząc 72h hodowle mysich fibroblastów (mFbr) w obecności otrzymanych materiałów (SiO₂+F, SiO₂+Cl) wygrzanych w trzech różnych temperaturach (50°C, 300°C, 500°C) na podłożu stali 316L (krążki) o chropowatości $R_a=0,1\ \mu\text{m}$ w 24-dółkowej płycie hodowlanej. Celem badań było określenie, który z syntezowanych żeli krzemionkowych na podłożu stali 316L oraz, które parametry nanoszenia żelu są korzystniejsze dla żywotności, wzrostu i proliferacji populacji mFbr. Ocenę bioakceptowalności zsyntezowanych żeli krzemionkowych oraz parametrów nanoszenia żelu dla żywotności i proliferacji mFbr, przeprowadzono na podstawie morfologii komórek w obrazie mikroskopowym, liczebności populacji komórek oraz parametrów opisujących całkowitą hodowlę oraz hodowlę na krążku.

3. WYNIKI

Badania przeprowadzone za pomocą SEM wykazały, iż zsyntezowane powłoki są ciągłe, bez wytrażeń zarówno przed jak i po próbie czteropunktowego zginania.

W wyniku pomiaru chropowatości zsyntezowanych powłok krzemionkowych na powierzchni stali nierdzewnej 316L otrzymano profilogramy, które opisują trzy podstawowe parametry chropowatości charakteryzujące powierzchnię (rys x):

- R_a -średnia arytmetyczna odchylenia profilu, określa chropowatość na odcinku pomiarowym l_m w odniesieniu do linii środkowej,
- R_t - maksymalna wysokość pomiędzy najwyższym szczytem, a najniższą doliną, przedstawia tzw. głębokość profilu,
- R_z - wysokość profilu chropowatości wg.10 ekstremów, wartość ta określa główny poziom bezwzględnej wartości pięciu najwyższych szczytów i najniższych dolin na odcinku pomiarowym l_m , zwana jest szerokością profilu.

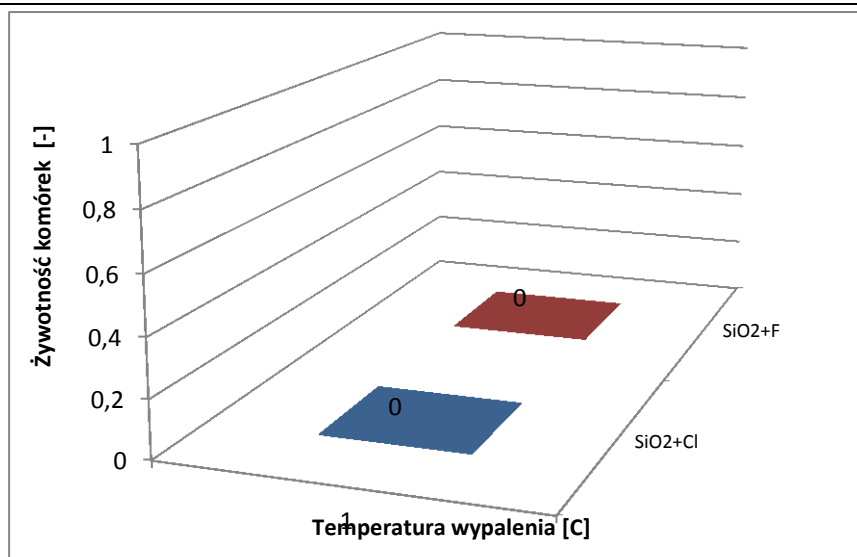
Tabela 1. Parametry chropowatości próbek

próbka	R_a [μm]	R_t [μm]	R_z [μm]
Stal 316L	0,100	2,385	1,246
SiO_2+Cl 50°C	0,170	3,689	2,744
SiO_2+Cl 300°C	0,170	5,335	2,995
SiO_2+Cl 500°C	0,110	5,243	1,937
SiO_2+F 50°C	0,075	1,154	0,762
SiO_2+F 300°C	0,078	1,720	0,815
SiO_2+F 500°C	0,069	1,015	0,743

Uzyskane parametry chropowatości wskazują, iż powłoki z chlorem zwiększyły wyznaczone parametry chropowatości, zaś powłoki z fluorem zmniejszyły ich wartość.

Stosując metody mikroskopowe (SEM) stwierdzono, iż realizacja 100 cyklicznych elastycznych obciążeń przy częstotliwości $f=1\text{Hz}$, nie spowodowała uszkodzenia warstw. Nie zaobserwowano pęknięć oraz odspojenia się warstwy od podłoża na skutek zastosowanych cyklicznych obciążeń. Powłoki po badaniach wytrzymałościowych nie zmieniły swoich charakterystycznych struktur.

Przeprowadzone badania biologiczne in vitro wykazują bioaktywność zsyntezowanych powłok przejawiającą się większą proliferacją i wysoką żywotnością komórek na podłożu z powłoką. Otrzymane rezultaty wskazują, że wszystkie badane żele są biozgodne, ponieważ proliferacja i przeżywalność hodowli były porównywalne z hodowlą kontrolną. Ponadto badania te wykazały brak niekorzystnego wpływu stali 316L, która stanowi podłoże dla wymienionych żeli. Niemniej jednak dyskretne różnice w wartościach parametrów opisujących hodowlę na krążkach ujawniają się przy porównaniu powłok krzemionkowych domieszkowanych innym pierwiastkiem (chlor/fluor) wygrzanych w tych samych temperaturach. Z porównania żywotności komórek pomiędzy poszczególnymi krążkami z powłoką wygrzaną w tej samej temperaturze wynika, iż parametr ten ma większą wartość dla powłok z domieszką chloru wysuszoną w 50°C, mniejszą dla powłok z chlorem wygrzanych w 500°C, zaś taką samą dla powłok z chlorem i fluorem wygrzanych w 300°C (Rys. 1).



Rys. 1. Wpływ powłok zol - żelowych na żywotność komórek na krążku

4. WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań krzemionkowych warstw wierzchnich otrzymanych metodą zol-żel sformułowano następujące wnioski:

1. Badania mikroskopowe (SEM) wykazały, iż zsyntezowane powłoki są ciągłe i wykazują dużą adhezję do podłoża,
2. Badania topograficzne wykazują, iż w zależności od składu zolu jak i temperatury obróbki termicznej można kształtować chropowatość powierzchni,
3. Na podstawie przeprowadzonej analizy mikroskopowej próbek po badaniach wytrzymałościowych można stwierdzić, że przy zastosowanych parametrach cyklicznych obciążeń powłoka nie ulegnie zniszczeniu,
4. Uzyskane wyniki badań biologicznych pozwalają sądzić, że uzyskane powłoki na podłożu stali 316L mogą stanowić przyjazny dla biocyty material do produkcji implantów medycznych. Zastosowana technika hodowli komórkowej oraz uzyskane dane pomiarowe świadczą o biokompatybilności badanych próbek. Kondycja i liczebność hodowli wskazują na możliwość spełnienia wymogów stawianym wszczepom przez środowisko tkankowe.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, iż istnieje możliwość syntezy metodą zol-żel stabilnych i powtarzalnych powłok tlenkowych stanowiących barierę dyfuzyjną pomiędzy wszczepem, a otaczającym go środowiskiem tkankowym oraz poprawiających bioakceptowalność implantu.

LITERATURA

- [1] Klein Lisa C.: Sol-Gel Technology for Thin Films, Preforms, Electronics, and Specialty Shapes. Hardcover, NOYES Publications, 1988,
- [2] Krzak-Roś J., Filipiak J., Pezowicz C., Baszczuk A., Miller M., Kowalski M., Będziński R.: The effect of substrate roughness on the surface structure of TiO₂, SiO₂, and doped thin films prepared by the sol-gel method. Acta of Bioengineering and Biomechanics, Vol. 11, No. 2, 2009.