

WSTĘPNA OCENA WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNO-ELEKTRYCZNYCH W ZAKRESIE NISKICH CZĘSTOTLIWOŚCI BIOMATERIAŁOWEGO MODELU DOŚWIADCZALNEGO KOŚCI DŁUGICH W STANIE PATOLOGICZNYM

RYSZARD UKLEJEWSKI^{1,2*}, TOMASZ CZAPSKI¹, MARIUSZ WINIECKI^{1,2}

¹ ZAKŁAD PODSTAW BIOINŻYNIERII MEDYCZNEJ, INSTYTUT TECHNIKI, UNIWERSYTET KAZIMIERZA WIELKIEGO W BYDGOSZCZY, UL. KAROLA CHODKIEWICZA 30, 85-064 BYDGOSZCZ

² ZESPÓŁ INŻYNIERII BIOPROCESÓW I BIOMATERIAŁÓW MEDYCZNYCH, ZAKŁAD INŻYNIERII PROCESOWEJ, INSTYTUT TECHNOLOGII I INŻYNIERII CHEMICZNEJ, POLITECHNIKA POZNAŃSKA, PL. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 2, 60-965 POZNAŃ

* E-MAIL: UKLEJEW@UKW.EDU.PL

Streszczenie

Przedstawiono wyniki doświadczalnych badań porównawczych dotyczących metod wytworzenia biomateriałowego modelu kości długich w stanie patologicznym, tj. nie w pełni zmineralizowanych (stan osteomalacji) oraz o obniżonym kościotworzeniu (stan osteoporotyczny), otrzymanego na bazie wołowych kości udowych, z wykorzystaniem stosowanych w inżynierii biomateriałów metod częściowego odbiałczania i częściowego odwapniania. Ten biomateriałowy model kości długich jest niezbędny do prowadzenia doświadczalnych badań właściwości strukturalno-elektrycznych kości długich w celu zbudowania prototypowego systemu pomiarowo-obliczeniowego do wyznaczania gęstości i parametrów porosprężystych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych oryginalną nieinwazyjną metodą elektroosteodensytometrii (zgłoszenie patentowe krajowe i międzynarodowe). Proces odbiałczania prowadzono porównawczo z użyciem roztworów NaOCl, H₂O₂, KOH i NaOH, natomiast proces odwapniania próbek kości wołowych prowadzono porównawczo z użyciem roztworów HNO₃, HCl i EDTA oraz w mieszaninie roztworów HNO₃ i HCHO. Zbadano kinetykę przeprowadzonych procesów, monitorując stężenia białka oraz wapnia w zastosowanych roztworach w funkcji czasu. Na podstawie zbadanych przebiegów procesów możemy obecnie zarekomendować do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym: o obniżonym kościotworzeniu – odbiałczanie z użyciem 7% roztworu nadtlenku wodoru (H₂O₂), a dla nie w pełni zmineralizowanych – odwapnianie z użyciem 0,5 M roztworu kwasu solnego (HCl). Przedstawiono pilotażowe wyniki doświadczalnej analizy właściwości strukturalno-elektrycznych biomateriałowego modelu kości długiej w stanie obniżonego kościotworzenia (badano trzy częściowo odbiałczone kości udowe wołowe) z wypełnieniem porów modelu wieloelektrolitowym płynem fizjologicznym Ringera, w zakresie niskich częstotliwości (od 20 Hz do 10 kHz) i w zależności od lokalizacji badanej próbki wzdłuż trzonu kości długiej. Stwierdzono, że: 1) wartości modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ [Ω/cm] trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej maleją bardzo wyraźnie w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do 500 Hz;

PRELIMINARY STUDY OF STRUCTURAL-ELECTRICAL PROPERTIES IN THE LOW FREQUENCY RANGE OF EXPERIMENTAL BIOMATERIAL MODELS OF LONG BONES IN A PATHOLOGICAL STATE

RYSZARD UKLEJEWSKI^{1,2*}, TOMASZ CZAPSKI¹, MARIUSZ WINIECKI^{1,2}

¹ DEPARTMENT OF MEDICAL BIOENGINEERING FUNDAMENTALS, INSTITUTE OF TECHNOLOGY, CASIMIR THE GREAT UNIVERSITY, KAROLA CHODKIEWICZA 30, 85-064 BYDGOSZCZ, POLAND

² LABORATORY OF MEDICAL BIOMATERIALS AND BIOPROCESS ENGINEERING, DEPARTMENT OF PROCESS ENGINEERING, INSTITUTE OF TECHNOLOGY AND CHEMICAL ENGINEERING, POZNAŃ UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,

MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE 2, 60-965 POZNAŃ, POLAND,

* E-MAIL: UKLEJEW@UKW.EDU.PL

Abstract

We present the results of a comparative experimental study on methods considered for the manufacture of a biomaterial model of long bones in a pathological state, i.e. insufficiently mineralized bone (osteomalacia) and reduced osteogenesis (osteoporosis), obtained from bovine femoral bone, using methods applied in the engineering of biomaterials such as partial deproteinization and partial demineralization. The biomaterial model is required for experimental research into the structural-electrical properties of long bones, which will be carried out to build a prototype for a measurement system for the evaluation of bone densitometry and poroelastic properties with the use of an original and non-invasive method of electroosteodensitometry (Polish and international patent applications). The kinetics of chemical bone deproteinization processes in NaOCl, H₂O₂, KOH and NaOH solutions and chemical bone demineralization processes in HNO₃, HCl, EDTA solutions and in a mixture of HNO₃ and HCHO were comparatively studied and the protein and calcium contents were monitored as a function of time. On the basis of the functional graphs obtained from the observed processes, we can currently recommend the following conditions for manufacturing a biomaterial model of long bones in a pathological state: deproteinization using a 7% solution of hydrogen peroxide (H₂O₂) to produce a model of bone in a state of reduced osteogenesis and decalcification with 0.5 M hydrochloric acid (HCl) to produce a model of insufficiently mineralized bone. The results of a pilot experimental analysis of the structural-electrical properties of the biomaterial model of long bones are presented for a state of reduced bone formation (osteoporotic; three partially deproteinized bovine femurs were examined). The bone pores of the model were filled with physiological multielectrolyte Ringer's saline and assessed in a low frequency range (20 Hz to 10 kHz) as a function of the location of bone shaft samples along the diaphysis. It was found that: 1) values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω/cm] of the bone shaft of the model osteoporotic long bone decreased very clearly as a function of frequency in the range from 20 Hz to ca. 500 kHz;

od częstotliwości 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości $|Z_1|$ są niewielkie, a powyżej częstotliwości 2 kHz wartość modułu impedancji jednostkowej $|Z_1|$ praktycznie nie zależy od zmian częstotliwości; 2) średnia wartość modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej okazała się względnie stała wzdłuż długości trzonu kości i wynosiła ok. 670 Ω/cm dla częstotliwości 100 Hz oraz ok. 630 Ω/cm dla częstotliwości 10 kHz. Otrzymane pilotażowe wyniki pomiarów parametrów elektrycznych określających właściwości strukturalno-elektryczne kości długich osteoporotycznych wymagają potwierdzenia na większej liczbie próbek trzonowo-kostnych częściowo odbiałczanych; planujemy też poszerzenie analizy doświadczalnej właściwości strukturalno-elektrycznych kości długich o obniżonej mineralizacji (częściowo odwapnionych).

Słowa kluczowe: właściwości elektryczne kości długich, osteoporoza, osteomalacja, biomateriałowy model doświadczalny kości, odbiałczanie kości, odwapnianie kości

[Inżynieria Biomateriałów 126 (2014) 12-22]

Wprowadzenie

Kość jako tkanka zmineralizowana stanowi jeden z naturalnych biomateriałów kompozytowych, składający się z macierzy organicznej (ok. 90% to kolagen typu I) i nieorganicznego fosforanowo-wapniowego minerału kostnego (hydroksyapatyt, HA). Fundamentalnym procesem fizjologicznym zachodzącym w porospzęstych kościach jest zjawisko elektrokinetycznego przepływu jonowego płynu śródkostnego w przestrzeni porowej, wywołane mechanicznym obciążaniem kości (*load induced bone fluid flow*) podczas codziennej aktywności fizycznej organizmu i związane z tym przepływem generowanie elektrycznych osteopotencjałów, które stymulują komórki tkanki kostnej (poprzez tzw. *voltage-gated calcium Ca^{2+} channels* obecne w błonach komórkowych komórek kostnych [1]) do odpowiedzi biologicznej prowadzącej do procesów regeneracji i przebudowy kości [2]. Badaniem biernych właściwości elektrycznych kości korowej i kości gąbczastej zajmowało się wielu autorów [3-13]. Brak jednak, jak dotąd, badań doświadczalnych właściwości elektrycznych całych elementów kostnych układu kostno-stawowego ludzkiego, jak i zwierząt doświadczalnych. Praca stanowi kontynuację wcześniejszych prac teoretycznych [14-19] i pierwszy etap zaplanowanych prac doświadczalnych, dotyczących opracowanej metody nieinwazyjnego określania gęstości i parametrów porospzęstych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych, będącej przedmiotem zgłoszenia patentowego w UP RP i Euro-PCT [20,21].

Celem tej pracy jest wytworzenie biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym i przeprowadzenie wstępnej oceny właściwości elektrycznych próbek modelowej kości długiej, które są funkcją biostruktury i składu chemicznego kości. Łączymy w jednej pracy wytworzenie biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym i przeprowadzenie wstępnych badań właściwości elektrycznych próbek trzonowo-kostnych modelowej kości długiej w stanie patologicznym, gdyż opracowana przez nas metoda wyznaczania parametrów strukturalno-mechanicznych (zależnych od zawartości białka oraz od zawartości wapnia w kości) kości długich w stanie patologicznym bazuje na pomiarze właściwości elektrycznych kości długiej.

from a frequency of 500 Hz to 2 kHz, the changes in the $|Z_1|$ value were small, and above 2 kHz, the $|Z_1|$ value practically did not depend on frequency changes. 2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ of the bone shaft of the model osteoporotic long bone was found to be relatively constant along the length of the bone shaft and was about 670 Ω/cm for a frequency of 100 Hz and about 630 Ω/cm for a frequency of 10 kHz. The results of the preliminary study on the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state require confirmation in a full experimental study on a larger number of model osteoporotic long bones; we are also planning to extend the experimental analysis to the structural-electrical properties of long bones with impaired mineralization (partially decalcified).

Keywords: electrical properties of long bones, osteoporosis, osteomalacia, experimental biomaterial model of long bones, deproteinization, decalcification

[Engineering of Biomaterials 126 (2014) 12-22]

Introduction

Bone, as a mineralized tissue, is a composite biomaterial built of an organic matrix (ca. 90% composed of type I collagen) and inorganic calcium phosphate bone mineral (hydroxyapatite, HA). The fundamental physiological process occurring in poroelastic bones is the electrokinetic phenomenon of intraosseous ionic fluid flow induced by mechanical bone loading (i.e. *load induced bone fluid flow*) arising from daily physiological activity in a living organism. This intraosseous ionic fluid flow generates electrical potentials in the bone, which can stimulate – via voltage-gated calcium Ca^{2+} channels in bone cell membranes [1] – the biological response of regeneration and remodeling in bone cells [2]. The passive electrical properties of cortical bone and cancellous bone have been investigated by several authors [3-13]. However, to date, there has been no experimental research on the electrical properties of whole bone elements of the human skeleton or of an experimental animal skeleton. This paper is a continuation of our earlier theoretical works [14-19] and the first stage of planned experimental research regarding the development of a non-invasive method to determine the density and poroelastic properties of normal and pathological long bones, which is the subject of our patent applications to Euro-PCT [20,21].

The major goal of this study was to produce an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state and a preliminary evaluation of the electrical properties of samples of this long bone model which are a function of the biostructure and chemical composition of bone. We combine in one paper the production of the experimental biomaterial model of long bones in a pathological state and preliminary studies on the electrical properties of bone shaft samples of the biomaterial model of long bones in a pathological state. The method developed by us for the determination of the structural-mechanical parameters of long bones in a pathological state (depending on the protein content and the calcium content of the bone) is based on the measurement of the electrical properties of long bone.

WYTWORZENIE BIOMATERIAŁOWEGO MODELU KOŚCI W STANIE PATOLOGICZNYM – DOŚWIADCZALNA ANALIZA PORÓWNAWCZA KINETYKI PROCESÓW PREPARATYKI KOŚCI

Głównym celem prowadzonych badań dotyczących zaprojektowania i wytworzenia odpowiednich biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym, tj. nie w pełni zmineralizowanych (stan osteomalacji) oraz o obniżonym kościotworzeniu (stan osteoporotyczny), jest porównawcza analiza przebiegu różnych procesów odbiałczania [22-26] oraz odwapniania [23,24,27-33] wołowej kości korowej trzonów kości długich, pod kątem możliwości zaprojektowania i wytworzenia takich biomateriałowych modeli doświadczalnych.

Materiały i metody

Badania kinetyki ośmiu możliwych procesów chemicznej preparatyki kości, w tym czterech procesów odbiałczania oraz czterech procesów odwapniania, prowadzono na próbkach wołowej kości korowej pobranych z trzonów ośmiu kości udowych; wykorzystano kości wołowe pozyskane z lokalnej ubojni. Kości udowe pozbawiono obu nasad, a trzony oczyszczono mechanicznie z tkanek miękkich, okostnej i śródkostnej, szpiku kostnego, a następnie precyzyjnie pocięto na pierścienie kostne o wysokości 5 mm. Dalej pierścienie kostne podzielono używając ręcznej piły na segmenty kostne, z których precyzyjnie wycięto sześciennie próbki o wymiarach 5 mm × 5 mm × 5 mm. Precyzyjne cięcie kości na pierścienie kostne oraz cięcie segmentów kostnych na sześciennie próbki kostne zrealizowano w warunkach ciągłego chłodzenia wodą na precyzyjnej przecinacze wyposażonej w tarczę diamentową (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany). Przygotowano 400 sześciennych próbek kości korowej, po 50 sztuk na każdy z badanych procesów chemicznej preparatyki. Kości oraz próbki kostne na wszystkich etapach przygotowania były przechowywane w 0,9% roztworze chlorku sodu (NaCl) w temperaturze 4°C.

Przed procesem odbiałczania próbki kości korowej z trzonów kości długich zostały odwodnione w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu (70%, 95%, 99,8% etanolu; dwie zmiany roztworu na każde stężenie, roztwory zmieniano co 24 h), oraz odtłuszczone w acetonie w kąpeli o stężeniach 90% i 99,8%, po dwie zmiany roztworu na każde stężenie (roztwory zmieniano co 24 h). Następnie próbki kostne zostały osuszone w laboratoryjnej suszarce komorowej SML 42/250/M (Zalmed, Polska) w temperaturze 60°C przez 24 h.

Grupy po 50 próbek kości korowej z trzonów kości długich odbiałczano w temperaturze 37°C przez 14 dni z codzienną wymianą roztworów, zanurzając każdą z grup próbek odpowiednio w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), 7% roztworze nadtlenu wodoru (H₂O₂), 1N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH). W trakcie procesu odbiałczania próbki kostne każdej z grup były umieszczone w 10 naczyniach z roztworem odbiałczającym (po 5 próbek w każdym z naczyń) i poddane wytrząsaniu na wytrząsarce wielozadaniowej ORBIT 1000 (Labnet, USA) w celu uzyskania optymalnej kinetyki procesu.

Prowadzono okresową kontrolę przebiegu procesu odbiałczania próbek kostnych (w 1, 2, 3, 5, 7 i 14 dniu) i określono końcowy punkt odbiałczania stosując metodę Lowry'ego [34]. W tym celu, przed rozpoczęciem procesu, jak również w trakcie jego trwania pobierano z każdego z odbiałczających roztworów próbki kontrolne. Zawartość białka w tych próbkach określano za pomocą spektrofotometru Shimadzu UV-2401 UV-VIS (Shimadzu Corporation, Japonia).

MANUFACTURING THE BIOMATERIAL MODEL OF PATHOLOGICAL BONE – COMPARATIVE STUDY OF THE KINETICS OF VARIOUS RESPECTIVE BONE PREPARATION PROCESSES

The major goal of this comparative study was to investigate the process progress of various deproteinization [22-26] and decalcification [23,24,27-33] procedures using bovine cortical bone and to evaluate the effectiveness regarding the design and manufacturing of suitable experimental models of long bones in a pathological state, i.e. insufficiently mineralized bone (osteomalacia) and reduced osteogenesis (osteoporosis).

Materials and methods

The kinetics of eight bone chemical treatment processes were comparatively studied using bovine cortical bone specimens taken from eight femur shafts, including four bone deproteinization processes and four bone decalcification processes; femoral bones were purchased from a local slaughterhouse. Both epiphyses of the femoral bones were first cut off and the bone shafts were mechanically cleaned of all soft tissues, periosteum, endosteum and bone marrow. Afterwards, the bone shafts were precisely cut into 5 mm thick bone rings. Then, from every ring, bone segments were cut using a hacksaw and the segments were precisely machined into cubes (5 mm × 5 mm × 5 mm). The precise cutting of bone shafts into rings and afterward into cubes was performed using a rotating diamond wheel saw (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) under constant water irrigation. A total number of 400 cortical bovine femur cubic specimens were prepared, i.e. 50 for each chemical treatment process investigated. Bones and fresh bone specimens after cutting were stored in 0.9 wt% sodium chloride (NaCl) at 4°C.

Before deproteinization, fresh cortical bone specimens from the femoral shaft were dehydrated in a series of alcohol baths (70 wt%, 95 wt%, 99.8 wt% ethanol, with two changes for each concentration and with the solvent refreshed daily), and degreased in a series of acetone baths (90 wt% and 99.8 wt%, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily). After that, the cortical bone specimens were dried in a laboratory chamber dryer SML 42/250/M (Zalmed, Poland) at 60°C overnight.

The chemical deproteinization processes were accomplished in packets of 50 specimens of femoral shaft cortical bone within 14 days at 37°C (the temperature was kept constant using a water bath) with the solvents refreshed daily. Each packet of bone specimens was immersed in: 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCl), 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), 1N potassium hydroxide (KOH) or 1N sodium hydroxide (NaOH). The process protocols were carried out in 10 vessels (not more than five specimens per vessel) that were constantly mixed using Orbit™ 300 Multipurpose Digital Vortexer (Labnet, USA).

The periodical evaluation of the course of all deproteinization processes was performed (after day 1, 2, 3, 4, 5, 7 and 14 of the process) and the completion of deproteinization was verified using protein analysis according to Lowry's method [34]. For this purpose, directly before beginning the deproteinization process, as well as during the process, the control bone specimens were taken from each deproteinizing agent. The protein content in control specimens was measured using a spectrophotometer (Shimadzu UV-2401 UV-VIS, Shimadzu Corporation, Japan).

Przed procesem odwapniania próbki kości wołowej korowej zostały odtłuszczone w acetonie w kąpeli o stężeniach 90% i 99,8%, po dwie zmiany roztworu na każde stężenie (roztwory zmieniano co 24 h). Po procesie odwapniania próbki kostne zostały odwodnione w szeregu alkoholi (etanol) o rosnącym stężeniu (70%, 95%, 99,8%; po dwie zmiany roztworu na każde stężenie, roztwory zmieniano co 24 h).

Grupy po 50 próbek kości korowej z trzonów kości długich odwapniano w temperaturze pokojowej zanurzając każdą z grup próbek odpowiednio w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl) oraz 10% roztworze kwasu azotowego (HNO_3) (roztwory zmieniano co dwie godziny), a także 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów: 10% kwasu azotowego (HNO_3) i 40% formaldehydu (HCHO); roztwory zmieniano co 24 h. W trakcie procesu odwapniania próbki każdej z grup były umieszczone w 10 naczyniach z roztworem odwapniającym (po 5 próbek w każdym z naczyń) i poddane wytrząsaniu na wytrząsarce wielozadaniowej ORBIT 1000 (Labnet, USA) w celu wytworzenia warunków dla uzyskania optymalnej kinetyki procesu.

Prowadzono okresową kontrolę przebiegu procesów odwapniania z zastosowaniem ilościowej analizy chemicznej, oznaczając kompleksometrycznie wapń znajdujący się w roztworze odwapniającym za pomocą roztworu mianowanego EDTA w obecności wodorotlenku sodowego (NaOH) i mureksydu ($\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_6 \cdot \text{NH}_3$), pełniącego rolę wskaźnika. Końcowy punkt procesu odwapniania określono stosując test chemiczny polegający na neutralizacji ostatnich wymian roztworu odwapniającego wodorotlenkiem amonu (NH_4OH) i dodaniu szczawianu amonu ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$) [33,35]. Brak osadu w próbce roztworu odwapniającego oznaczał, że nie ma w nim jonów wapnia.

Wyniki i dyskusja

RYS. 1 przedstawia krzywe spadku zawartości białka w próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych poddanych odbiałczaniu w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), 7% roztworze nadtlenu wodoru (H_2O_2), 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH). Na wykresie na RYS. 2 zaprezentowano krzywe spadku zawartości wapnia w próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych poddanych odbiałczaniu w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl), 10% roztworze kwasu azotowego (HNO_3), 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO_3) i 40% roztworu formaldehydu (HCHO).

Procesy chemicznego odbiałczania próbek kości korowej z trzonów kości długich wołowych prowadzone w 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz w 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH) przerwano po 7 dniach, ponieważ próbki kostne zaczęły stawać się miękkie i następnie zaczęły rozpuszczać się. Zawartość białka w próbkach po 7 dniu odbiałczania w tych roztworach określona została na poziomie 35% i 39% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów KOH i dla NaOH. Proces kontynuowano do 14 dnia dla pojedynczych (najlepiej zachowanych) próbek kostnych, określając w nich końcową zawartość białka na poziomie 18% i 22% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów NaOH i KOH. Zawartość białka w próbkach odbiałczanych w 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl) i w 7% roztworze nadtlenu wodoru (H_2O_2) po 7 dniu prowadzenia procesu określono na poziomie 12% i 13% w odniesieniu do początkowej zawartości białka, odpowiednio dla roztworów NaOCl i H_2O_2 .

Before decalcification, the fresh femoral shaft cortical bone specimens were degreased in a series of acetone baths (90 wt% and 99.8 wt%, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily). After decalcification, the cortical bone specimens were dehydrated in a series of alcohol baths (70 wt%, 95 wt%, 100 wt% ethanol, with two changes for each concentration and the solvent refreshed daily).

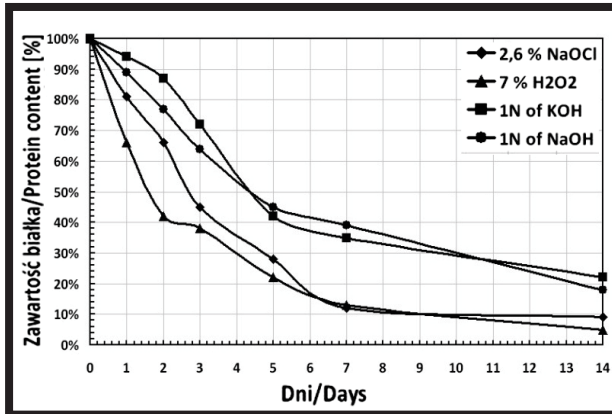
The chemical decalcification processes were accomplished in packets of 50 specimens of femoral shaft cortical bone at room temperature. Each packet of bone specimens was immersed in: 0.5 M hydrochloric acid (HCl) or 10 wt% nitric acid (HNO_3), with the solvents refreshed every two hours, and in: 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO_3) and 40 wt% formaldehyde (HCHO), with the solvents refreshed daily. The process protocols were carried out in 10 vessels (not more than five specimens per vessel) that were constantly mixed using Orbit™ 300 Multipurpose Digital Vortexer (Labnet, USA).

The periodical evaluation of the course of all decalcification processes was performed by determining the calcium concentration in the solvents by complexometric titration of the demineralization compound solution using a standard volumetric EDTA solution in the presence of sodium hydroxide (NaOH) and murexide ($\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_6 \cdot \text{NH}_3$) as indicators. The end-point of decalcification was determined with the ammonium oxalate test: the 5 ml samples of the final changes of decalcifiers were neutralized by adding drops of ammonium hydroxide (NH_4OH) and when the solutions turned litmus blue (pH above 7), the 5 ml of saturated aqueous solution of ammonium oxalate ($\text{C}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$ about 3%; stable stock solution) was added [33,35] to precipitate the Ca^{2+} from each of the decalcifying fluid. When no more Ca-oxalate precipitate was seen in the most recent change of decalcifying fluid, then the decalcification was completed.

Results and Discussion

FIG. 1 presents the curves of the kinetics of the protein content decrease in bovine femoral shaft cortical bone specimens during the deproteinization processes using 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCl), 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide (NaOH). FIG. 2 shows the calcium content decrease in the solvents during the decalcification processes using 0.5 M hydrochloric acid (HCl), 10 wt% nitric acid (HNO_3), 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO_3) and 40 wt% formaldehyde (HCHO).

The processes of chemical deproteinization of bovine cortical bone specimens in 1N potassium hydroxide (KOH) solution and in 1N sodium hydroxide (NaOH) solution were completed after 7 days, because majority of the specimens had started to soften and dissolve. According to Lowry's method, the protein concentration in these bone specimens were at circa 42% and 45% of protein content at the beginning of the deproteinization process for KOH and NaOH, respectively. For several isolated (well preserved) specimens, the processes were continued until day 14 and the protein concentration assessed at this point was 18% and 22% of the protein content at the beginning of the deproteinization process, for NaOH and KOH, respectively. The protein concentration in bone specimens deproteinized with 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCl) and in 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2) after day 7 were at 12% and 13% of the protein content at the beginning of the deproteinization process, for NaOCl and H_2O_2 , respectively.

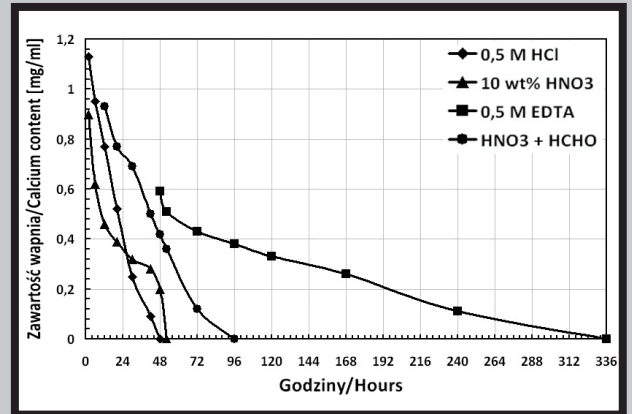


RYS. 1. Charakterystyki spadku zawartości białka w funkcji czasu w odbiałczanych chemicznie próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych w: 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂), 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz 1 N roztworze wodorotlenku sodu (NaOH).

FIG. 1. Diagram presenting the observed decrease in protein content at various time intervals during the process of chemical deproteinization of bovine femoral shaft cortical bone specimens, with the use of the following solutions: 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCl), 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide (NaOH).

Nie zaobserwowano istotnych zmian po 7 dniu prowadzenia procesu w 2,6% roztworze podchlorynu sodu (NaOCl), ponieważ stężenie białka w próbkach kości korowej po kolejnych 7 dniach procesu zmniejszyło się jedynie o 3%. Zaobserwowano największą szybkość przebiegu procesu odbiałczania w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂), dla którego zawartość białka w próbkach kości korowej po 48 h trwania procesu spadła do 40% w odniesieniu do początkowej zawartości białka. Zawartość białka w próbkach odbiałczanych w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H₂O₂) po 14 dniach wynosiła 5% w odniesieniu do początkowej zawartości białka.

Procesy chemicznego odwapniania prowadzone w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl) oraz 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃), oba zakończone po 48 h, przebiegały wyraźnie szybciej, w porównaniu do procesów prowadzonych w 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz w mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% formaldehydu (HCHO), które zakończyły się odpowiednio po 5 i 14 dniach. W przypadku roztworu EDTA pierwsze efekty prowadzonego procesu odwapniania można było zaobserwować dopiero po 48 h. W początkowej fazie trwania procesów odwapniania prowadzonych w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) oraz 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl), ich szybkości były podobne, ale po 24 h proces prowadzony w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) wyraźnie wyhamował w stosunku do procesu prowadzonego w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl), dla którego intensywność odwapniania próbek kostnych była praktycznie stała przez cały analizowany czas. Skuteczność procesów odwapniania w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl) oraz w 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃) jest zbliżona, ponieważ w obu przypadkach po ok. 48 h prowadzenia procesu doszło do praktycznie całkowitego odwapnienia próbek.



RYS. 2. Charakterystyki spadku zawartości wapnia w funkcji czasu w odwapnianych chemicznie próbkach kości korowej z trzonów kości długich wołowych w: 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl), 10% roztworze kwasu azotowego (HNO₃), 0,5 M roztworze wersenianu disodowego (EDTA) oraz mieszaninie 50/50% roztworów 10% kwasu azotowego (HNO₃) i 40% roztworu formaldehydu (HCHO).

FIG. 2. Diagram of the calcium content decrease in solvents during the decalcification process using: 0.5 M hydrochloric acid (HCl), 10 wt% nitric acid (HNO₃), 0.5 M disodium versenate (EDTA) and a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO).

The continuation of the deproteinization process carried out in 2.6 wt% sodium hypochlorite (NaOCl) led to insignificant changes after day 7, because after another 7 days of the process, the protein concentration in the bone specimens had decreased by only 3%. A high rate of the deproteinization process was observed in the case of 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), for which the protein contents after first 48 h decreased up to 40% of the protein content at the beginning of the deproteinization process. After day 14 of the process carried out in 7 wt% hydrogen peroxide (H₂O₂), the protein content in specimens was about 5% of the protein content at the beginning of the deproteinization process.

The processes of chemical decalcification in 0.5 M hydrochloric acid (HCl), 10 wt% nitric acid (HNO₃), both completed after 48 h, had higher rates in comparison to the processes of chemical decalcification in 0.5 M disodium versenate (EDTA) and in a 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO₃) and 40 wt% formaldehyde (HCHO), which were completed after 5 and 14 days, respectively. In the case of the decalcification process in 0.5 M disodium versenate (EDTA), the first effects of the process were observed only after 48 h. In the initial phase of the decalcification process in 10 wt% nitric acid (HNO₃) and in 0.5 M hydrochloric acid (HCl), the rates were similar, but after 24 h, the process carried out in 10 wt% nitric acid (HNO₃) was significantly slowed down in comparison to the decalcification process carried out in 0.5 M hydrochloric acid (HCl), for which the intensity of decalcification was practically constant. The efficiency of the decalcification processes in 0.5 M hydrochloric acid (HCl) and 10 wt% nitric acid (HNO₃) was similar, because complete decalcification was attained in both cases after 48 h of the process.

Podsumowanie części badawczej I

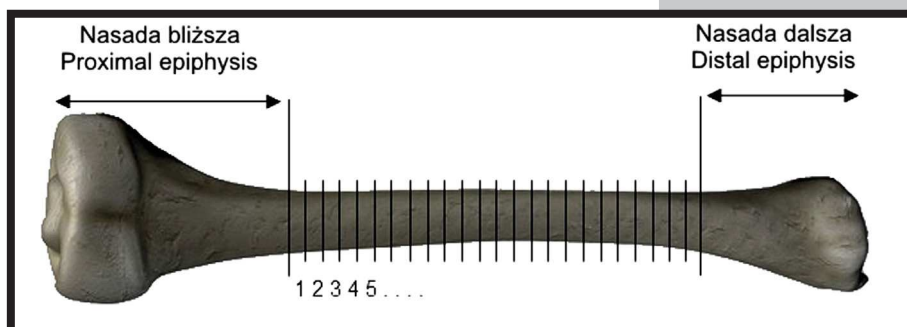
Najlepszy efekt procesu odbiałczania próbek kości korowej z trzonów kości długich wołowych uzyskano dla procesu prowadzonego w 7% roztworze nadtlenku wodoru (H_2O_2), dla którego proces ten przebiegał najbardziej intensywnie – 60% białka usunięto po 48 h prowadzenia procesu – oraz najbardziej skutecznie – po 14 dniach z próbek kości korowej usunięte zostało do 95% białka macierzy kostnej (głównie kolagenu). Proces odbiałczania w 2,6% roztworze podchlorynu sodu ($NaOCl$), charakteryzował się mniejszą szybkością, ale po 7 dniach, jak wynika z otrzymanych charakterystyk kinetyki procesów zaprezentowanych na RYS. 1, dla obu tych roztworów uzyskano zbliżony poziom odbiałczenia, określony procentowym spadkiem zawartości białka w próbkach kontrolnych w odniesieniu do początkowej jego zawartości. Ze względu na zaobserwowane od ok. 6 dnia trwania procesu miękniecie próbek kostnych zanurzonych w 1 N roztworze wodorotlenku potasu (KOH) oraz w 1 N roztworze wodorotlenku sodu ($NaOH$), a także wyraźnie mniejszą prędkość przebiegu procesu i istotnie mniejszą skuteczność, odbiałczanie w tych roztworach uznano za nieefektywne.

Najlepszy efekt odwapnienia próbek kości wołowej uzyskano dla procesu prowadzonego w 0,5 M roztworze kwasu solnego (HCl). W tym przypadku praktycznie stała szybkość procesu odwapniania próbek kostnych ułatwia zaprojektowanie biomateriałowego modelu kości w stanie patologicznym o założonym stopniu częściowego odwapnienia. Procesy odwapniania w 0,5 M roztworze wersenianu disodowego ($EDTA$) oraz mieszanie 50/50 10% roztworu HNO_3 i 40% roztworu formaldehydu ($HCHO$), ze względu na dużo mniejszą szybkość procesu nie były rekomendowane do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym.

PILOTAŻOWE BADAŃ DOŚWIADCZALNE NISKOCZĘSTOTLIWOŚCIOWYCH WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNO-ELEKTRYCZNYCH BIOMATERIAŁOWEGO MODELU KOŚCI DŁUGICH W STANIE PATOLOGICZNYM

Materiały i metody

Do pilotażowych badań właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym (kość osteoporotyczna) zastosowano biomateriałowy model doświadczalny kości długich częściowo odbiałczonych (ok. 10% odbiałczenia), wytworzony z zastosowaniem procesu wytypowanego na podstawie przedstawionej w rozdziale 2 analizy porównawczej kinetyki przeprowadzonych procesów odbiałczania kości. Po odcięciu nasad bliższej i dalszej, (RYS. 3), z części środkowej wołowej kości udowej z zastosowaniem precyzyjnej przecinarki wyposażonej w tarczę diamentową (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) wycięto próbki trzonowo-kostne w postaci pierścieni o wysokości 10 mm.



RYS. 3. Schemat sposobu cięcia badanej kości długiej i numeracji ciętych próbek trzonowo-kostnych.

FIG. 3. A scheme of the manner of cutting the tested long bone and numbering of the bone shaft samples.

Concluding remarks from the research part I

The best deproteinization effect in cortical bone specimens taken from bovine femur shafts was observed for the deproteinization process in 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), for which the highest rate of the process was observed – 60% of bone proteins were removed in the first 48 h of the process; this process was also the most efficient – 95% of bone proteins were removed from bovine cortical bone specimens. The deproteinization process in 2.6 wt% sodium hypochlorite ($NaOCl$) had a slower rate in comparison to the deproteinization process in 7 wt% hydrogen peroxide (H_2O_2), but as it can be read from the diagram of the deproteinization kinetics shown in FIG. 1, for both processes, the same level of deproteinization was observed, as characterized by the percentage protein decrease referring to the protein content at the beginning of the deproteinization process. Because of the softening and dissolving of most bone specimens deproteinized in 1 N potassium hydroxide (KOH) and 1 N sodium hydroxide ($NaOH$), as well as the distinctly lower rate of the process and considerably reduced efficiency, the deproteinization processes in these agents we judged as ineffective.

The best decalcification effect in cortical bone specimens was observed for the process carried out in 0.5 M hydrochloric acid (HCl). In this case, the practically constant rate of the process facilitates the design of a biomaterial model of the pathological bone to the desired level of partial decalcification. Because of the significantly lower rate, the processes of decalcification in 0.5 M disodium versenate ($EDTA$) and in the 50/50 mixture of 10 wt% nitric acid (HNO_3) and 40 wt% formaldehyde ($HCHO$) are not recommended for the manufacture of a biomaterial model of pathological bone.

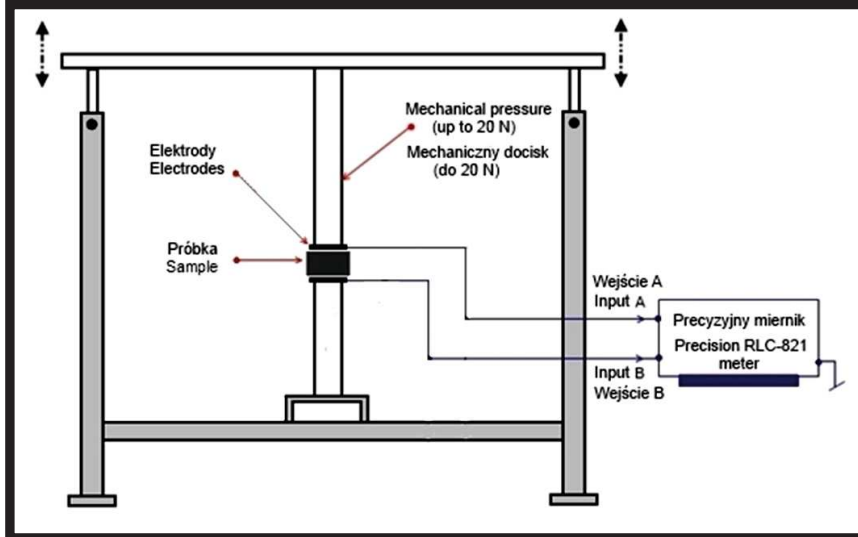
PRELIMINARY STUDY ON THE LOW-FREQUENCY STRUCTURAL-ELECTRICAL PROPERTIES OF BIOMATERIAL EXPERIMENTAL MODEL OF LONG BONES IN A PATHOLOGICAL STATE

Material and methods

For the preliminary studies of the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic bone) state, the biomaterial experimental model of partially deproteinized bone (ca. 10% deproteinization) was used, manufactured using the deproteinization process found to be the most effective in the comparative study presented above on the kinetics of various bone deproteinization processes. After cutting off the proximal and distal epiphyses (FIG. 3), 10 mm bone rings were cut out from the bone shaft using a rotating diamond wheel saw (IsoMet™ 4000 Linear Precision Saw, Buehler, Germany) under constant water irrigation.

Próbki trzonowo-kostne zostały zanurzone w wieloelektrolitowym płynie fizjologicznym Ringera i przechowywane do następnego dnia w chłodziarce w temperaturze 4°C. Bezpośrednio przed pomiarem z każdej próbki został usunięty powierzchniowy nadmiar płynu fizjologicznego. Czas trwania pomiaru wartości parametrów elektrycznych dla poszczególnych próbek określano na podstawie osiągnięcia przez układ pomiarowy stanu ustalonego.

Pomiary wartości wybranych parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych wykonano metodą dwuelektrodową z zastosowaniem precyzyjnego miernika RLC-821 (GWINSTEK, UK), który umożliwił pomiar wartości impedancji elektrycznej w zakresie częstotliwości: od 20 Hz do 10 kHz z błędem $\pm 0.03\%$ oraz w zależności od położenia (lokalizacji) badanej próbki wzdłuż modelowego trzonu kostnego. Zmierzono wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ próbek trzonowo-kostnych oraz wyznaczono wartości modułu impedancji elektrycznej kości długiej na jednostkę długości $|Z_1|$, reaktancji na jednostkę długości X_1 oraz rezystancji na jednostkę długości R_1 . Schemat stanowiska pomiarowego zbudowanego do wyznaczania wartości parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym przedstawiono na RYS. 4. Elektrody pomiarowe o średnicy 30 mm i 40 mm wykonane ze stali nierdzewnej (AISI 316L) zamocowano na izolowanym elemencie mocująco-obciążającym (RYS. 4), umożliwiającym dostosowanie odległości między elektrodami do rozmiarów badanych próbek trzonowo-kostnych, i zastosowano odpowiedni mechaniczny docisk (do ok. 20 N) elektrod do powierzchni próbek. W celu poprawy kontaktu pomiędzy elektrodą a badaną próbką trzonowo-kostną zastosowano pastę przewodzącą Ten20 Conductive (Weaver and Company, USA).



RYS. 4. Schemat stanowiska pomiarowego do wyznaczania wartości parametrów elektrycznych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich w stanie patologicznym.

FIG. 4. The scheme of the measurement system for the determination of the electrical parameters of bone shaft specimens of an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state.

Wyniki i dyskusja

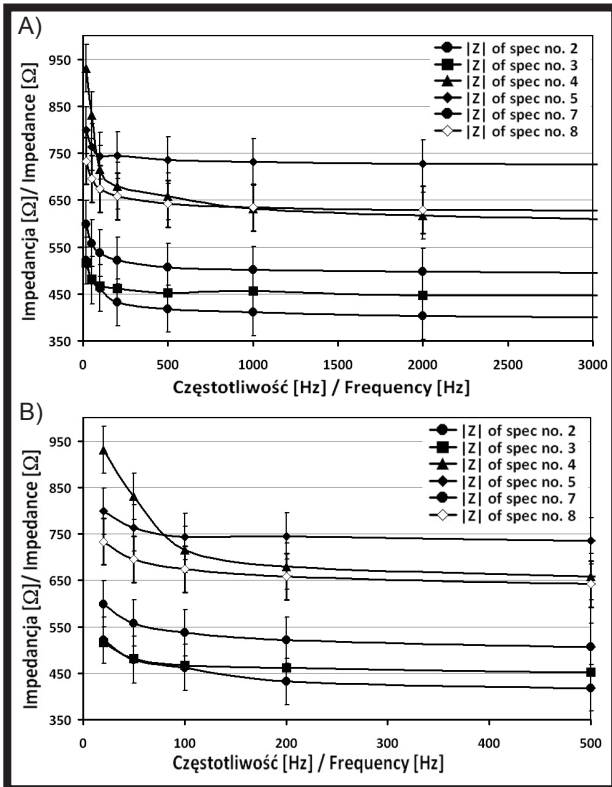
Przykładowe wyniki przeprowadzonych pomiarów wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ [Ω] niektórych pierścieniowych próbek trzonowo-kostnych, pochodzących ze środkowej części biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (ok. 10% odbiałczona kość) po odcięciu obu części nasadowych, w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do 10 kHz, przedstawiono na RYS. 5. Numeracja próbek trzonowo-kostnych odpowiada ich lokalizacji określonej kolejno względem początku środkowej części (tj. względem krańcowego przekroju poprzecznego odciętej nasady bliższej) badanego modelu doświadczalnego kości długiej.

Then, the long bone shaft specimens in the shape of bone rings were immersed in multi-electrolyte Ringer's solution and stored until the next day at 4°C. Shortly before the measurement of the electrical properties, the excess physiological saline was removed from the surface of each bone specimen. The duration of the measurement of electrical parameters in individual samples was determined on the basis of the time required for the measurement system to reach a steady state.

The measurements of the chosen electrical parameters of the bone shaft specimens from the biomaterial model of osteoporotic long bone were performed by the double-electrode method using a precision RLC-821 meter (GWINSTEK, UK) that allowed electrical impedance values to be measured in the frequency range from 20 Hz to 10 kHz with an error of 0.03%, and depending on the position (location) of the sample along the model bone shaft. The values of the electrical impedance modulus $|Z|$ of long bone shaft rings were measured, and the values of the electrical impedance modulus of long bone per unit length $|Z_1|$, the reactance per unit length X_1 , and the resistance per unit length R_1 were determined. A scheme of the measurement system built for the determination of the electrical parameters of bone shaft specimens from an experimental biomaterial model of long bones in a pathological state is presented in FIG. 4. Measuring electrodes with a diameter of 30 mm and 40 mm made of stainless steel (AISI 316L) were mounted on an isolated fixing-loading element (FIG. 4), which allows for the adjustment of the distance between the electrodes according to the size of the tested long bone shaft samples. Moreover, the appropriate mechanical load (up to 20 N) of the electrodes on the surface of the samples was applied. In order to improve the contact between electrodes and the tested long bone shaft samples, the TEN20 Conductive paste (Weaver and Company, USA) was used.

Results and discussion

The results of the measurements of the electrical impedance modulus $|Z|$ [Ω] values of the ring-form bone shaft samples coming from the central part of the biomaterial model of long osteoporotic bones (ca. 10% deproteinized) after cutting off both bone epiphyses, in the frequency range from 20 Hz to 10 kHz, are presented in FIG. 5. The numbering of the long bone samples corresponds to their location with respect to the beginning of the middle part (i.e. with respect to the limit cross-section of the cut off proximal epiphysis) of the examined experimental model of long bone.

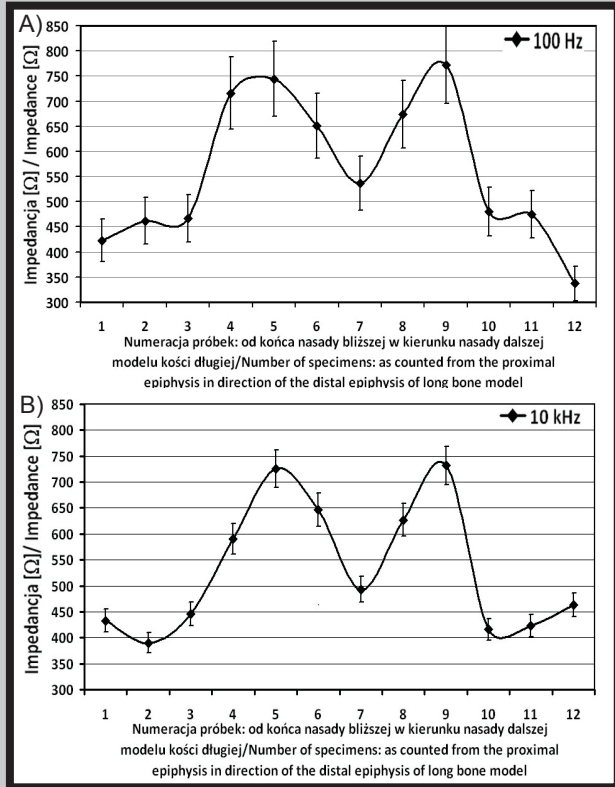


RYS. 5. Wartości modułu impedancji $|Z|$ [Ω] niektórych próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (częściowo odbiałczona kość, o ok. 10%) w funkcji częstotliwości w zakresie: A) od 20 Hz do 3 kHz i B) od 20 Hz do 500 Hz (początkowy zakres charakterystyk w powiększeniu).

FIG. 5. The values of electrical impedance $|Z|$ [Ω] of some bone shaft samples from the biomaterial model of osteoporotic long bone (partially deproteinized; about 10%) as a function of frequency, ranging from: A) 20 Hz to 3 kHz and B) 20 Hz to 500 Hz (initial range of the characteristics in the inset).

Na podstawie zmierzonych wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ próbek trzonowo-kostnych badanego modelu doświadczalnego można stwierdzić, że wartości modułu impedancji $|Z|$ tych próbek wyraźnie maleją (tj. średnio o ok. 140 Ω) w zakresie częstotliwości od 20 Hz do 500 Hz (RYS. 5B). W zakresie częstotliwości od 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości $|Z|$ są niewielkie; powyżej częstotliwości 2 kHz wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ praktycznie nie zmieniają się. Oznacza to, że wartość reaktancji elektrycznej $X(\omega=2\pi f)$ próbek trzonowo-kostnych badanego modelu doświadczalnego jest w zakresie powyżej częstotliwości 2 kHz praktycznie równa zero, a wartość modułu impedancji $|Z|$ badanych próbek modelowej kości długiej w zakresie częstotliwości powyżej 2 kHz jest praktycznie równa wartości rezystancji R [Ω] tych próbek (gdyż R nie jest funkcją częstotliwości): $R(\omega) = \text{const} = |Z|$ dla $f \geq 2$ kHz.

Na wykresach (RYS. 6A i B) przedstawiono przykładowe wyniki pomiarów wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ próbek trzonowo-kostnych badanego biomateriałowego modelu kości długich osteoporotycznych (modelowa kość odbiałczona o ok. 10%) po odcięciu obu części nasadowych, w zależności od lokalizacji badanej próbki oznaczonej numeracją postępującą od krańcowego przekroju poprzecznego odciętej nasady bliższej kolejno wzdłuż długości trzonu kości; wyniki dotyczą dwóch wybranych częstotliwości: 100 Hz oraz 10 kHz.



RYS. 6. Wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ [Ω] próbek trzonowo-kostnych biomateriałowego modelu doświadczalnego kości długich osteoporotycznych (w ok. 10% odbiałczona kość) po odcięciu obu części nasadowych, w zależności od lokalizacji badanej próbki wzdłuż długości trzonu kości, dla częstotliwości: A) 100 Hz oraz B) 10 kHz.

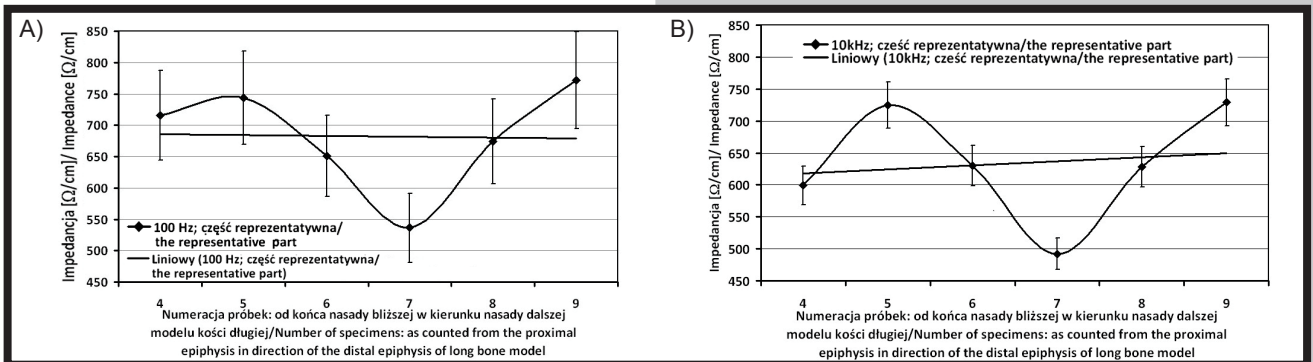
FIG. 6. The measured values of the electrical impedance modulus $|Z|$ [Ω] of bone shaft samples of the examined biomaterial model of osteoporotic long bone (bone deproteinized by ca. 10%) after cutting off both epiphyses, as a function of the specimen location along the long bone shaft for frequencies of A) 100 Hz and B) 10 kHz.

As it can be seen from the diagrams presented in FIG. 5, the measured values of the electrical impedance $|Z|$ [Ω] of long bone shaft samples from the investigated experimental model of osteoporotic long bone decreased significantly (averagely by 140 Ω) in the frequency range from 20 Hz to 500 Hz (FIG. 4B). In the frequency range from 500 Hz to 2 kHz, the changes of the measured $|Z|$ values were small; above 2 kHz, the measured values of the electrical impedance modulus $|Z|$ practically did not change. This means that the values of the electrical reactance $X(\omega=2\pi f)$ of bone shaft samples of the examined experimental model are practically equal to zero in the range above 2 kHz, and the value of the impedance modulus $|Z|$ of these samples in the frequency range above 2 kHz is practically equal to their resistance R [Ω] (since R is not a function of frequency): $R(\omega) = \text{const} = |Z|$ for $f \geq 2$ kHz.

FIGS. 6 A and B present the results (for frequencies 100 Hz and 10 kHz) of measurements of the values of the electrical impedance modulus $|Z|$ of bone shaft samples of the examined biomaterial model of osteoporotic long bones (bone deproteinized by ca. 10%) as a function of the specimen position (location) along the long bone shaft, as counted from the side of the cut off proximal epiphysis.

Z przedstawionych na RYS. 6 wykresów rozkładu wartości modułu impedancji elektrycznej $|Z|$ wzdłuż długości trzonu badanej modelowej kości długiej po odcięciu obu jej części nasadowych, wynika wyraźnie, że wartości modułu impedancji $|Z|$ próbek kostnych odpowiadające części środkowej trzonu badanej kości różnią się o ok. 40-50% od wartości odpowiadającym jej krańcowym segmentom. Te krańcowe segmenty badanej środkowej części modelowej kości długiej odpowiadają tzw. przynasadom kości długiej, przy czym przynasada bliższa znajduje się pomiędzy nasadą bliższą (tu odciętą) a trzonem kości długiej, natomiast przynasada dalsza – analogicznie: pomiędzy nasadą dalszą (tu odciętą) a trzonem. Z obserwacji powyższej wypływa wniosek, że jeśli chcemy otrzymać reprezentatywne wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω/cm] (tj. impedancji odniesionej do jednostki długości kości) dla trzonu badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej, to powinniśmy wziąć pod uwagę wartości modułu impedancji jednostkowej $|Z_1|$ [Ω/cm] próbek trzonowo-kostnych, odpowiadające części środkowej badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej, przedstawione odpowiednio na RYS. 7 A i B.

In FIG. 6, the distributions of the values of the electrical impedance modulus $|Z|$ along the length of the examined biomaterial model of long bone are shown, and reveal that the values of the electrical impedance modulus $|Z|$ corresponding to the medial part of the examined long bone shaft differ by about 40-50% from the values of the electrical impedance modulus $|Z|$ corresponding to the terminal segments. These terminal segments of the examined medial part of long bone shaft were recognized (identified) as the metaphyses of long bone; the proximal metaphysis is located between the proximal epiphysis and the long bone shaft, while the distal metaphysis is located between the distal epiphysis and the long bone shaft. This allowed us to conclude that, for the assessment of representative values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω/cm] (i.e. referred to the unit of length of long bone) of the bone shaft of the examined model of osteoporotic long bone, one should take into account the results obtained for the bone shaft specimens from the medial regions of the examined shaft, as shown in FIGs. 7 A and B.



RYS. 7. Wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω/cm] odpowiadające części środkowej badanej modelowej kości długiej osteoporotycznej (w ok. 10% odbiałczona kość), w zależności od lokalizacji badanych próbek (o dł. 1cm) wzdłuż trzonu kości długiej, przy częstotliwości: A) 100 Hz oraz B) 10 kHz.
FIG. 7. The values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω/cm] corresponding with the medial part of the examined model of osteoporotic long bone (deproteinized by about 10%), as a function of the bone sample location along the long bone shaft; the results show frequencies of A) 100 Hz and B) 10 kHz.

Z przedstawionych na RYS. 7 wykresów rozkładu wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ wzdłuż długości badanego modelu kości długiej osteoporotycznej oraz z wyznaczonych linii trendu wynika, że:

1) średnia wartość modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω/cm] odpowiadająca części środkowej badanej kości długiej, wynosi ok. 670 Ω/cm przy częstotliwości 100 Hz i jest względnie stała wzdłuż trzonu kości; zmienność tej wartości średniej wzdłuż trzonu badanej kości długiej jest nieznaczna – poniżej 1%;

2) średnia wartość modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ [Ω/cm] odpowiadająca części środkowej badanej kości długiej wynosi ok. 630 Ω/cm przy częstotliwości 10 kHz, zmienność tej wartości średniej wzdłuż trzonu badanej kości długiej jest niewielka – poniżej 5%.

Lokalne obniżenie wartości modułu jednostkowej impedancji elektrycznej $|Z_1|$ w stosunku do linii trendu wyznaczającej wartość średnią modułu tej impedancji, widoczne w środkowej części trzonu badanej modelowej kości długiej (udowej), wynika prawdopodobnie z istniejącego w tym miejscu przyczepu mięśnia przywodzącego udo i całą kończynę dolną (m. przywodziciel długi uda, *m. adductor femoris longus*) i aktywności tego mięśnia. Pociąganie przez ten mięsień materiału fazy stałej kości korowej w środkowej części trzonu kości udowej może prowadzić do lokalnego poszerzenia przestrzeni porowej kości, co skutkuje zmniejszeniem wartości rezystancji i impedancji elektrycznej kości w tym podobszarze.

FIG. 7 shows the distributions of the values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω/cm] along the length of the examined long bone biomaterial model. From the plotted trend lines, it was found that:

1) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ corresponding to the middle part of the examined bone is approximately equal to 670 Ω/cm at a frequency of 100 Hz and is relatively constant along bone shaft. The variability of this mean value along the examined long bone shaft is negligible, i.e. less than 1%.

2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ corresponding to the middle part of the examined bone is approximately equal to 630 Ω/cm at a frequency of 10 kHz; the variability of this mean value along the examined long bone shaft is small, i.e. less than 5%.

The local decrease in the values of the unit electrical impedance modulus $|Z_1|$ relative to the trend line defining the mean value of that impedance modulus, seen in the middle part of shaft of the examined model long bone (femur), is probably due to a muscle attachment existing in this location and the activity of this muscle – it is the attachment of the muscle adducting the thigh and the entire lower limb (*musculus adductor femoris longus*). Stretching the solid phase material of cortical bone by this muscle in the middle part of femur shaft can lead to a local widening of the bone pore space, which results in a decrease in the value of electrical resistance and impedance of bone in this region.

W celu weryfikacji postawionej wyżej roboczej hipotezy badawczej planujemy przeprowadzenie pełnego badania doświadczalnego właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym (na większej liczbie modelowych trzonów kości długich) obejmujące również bezpośrednie badania struktury wewnętrznej próbek trzonowo-kostnych, tj. określenie względnej objętości materiału fazy stałej tych próbek.

Znajomość wartości parametrów struktury wewnętrznej badanych próbek trzonowo-kostnych umożliwi właściwe zinterpretowanie otrzymanych wyników pomiarów wartości jednostkowej impedancji elektrycznej trzonów kości długich i pozwoli ilościowo określić istniejące uwarunkowanie elektrycznych właściwości trzonów kości długich poprzez wartości parametrów struktury kości.

Wnioski

Na podstawie doświadczalnej analizy porównawczej kinetyki badanych procesów preparatyki kości zaproponowano do wytworzenia biomateriałowych modeli doświadczalnych kości długich w stanie patologicznym: 1) odbiałczanie kości z użyciem 7% roztworu nadtlenu wodoru (H_2O_2) – dla wytworzenia modelu doświadczalnego kości w stanie obniżonego kościotworzenia (kość osteoporotyczna), 2) odwapnianie kości z użyciem 0,5 M roztworu kwasu solnego (HCl) – dla wytworzenia modelu doświadczalnego kości w stanie obniżonej mineralizacji (stan osteomalacji).

W wyniku przeprowadzonej pilotażowej eksperymentalnej oceny właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich osteoporotycznych w zakresie niskich częstotliwości (20 Hz do 10 kHz) można stwierdzić, że: 1) wartości modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ [Ω/cm] trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej maleją bardzo wyraźnie w funkcji częstotliwości w zakresie od 20 Hz do ok. 500 Hz; od częstotliwości 500 Hz do 2 kHz zmiany wartości $|Z_1|$ są niewielkie, a powyżej częstotliwości 2 kHz wartość modułu impedancji jednostkowej $|Z_1|$ praktycznie nie zależy od zmian częstotliwości; 2) średnia wartość modułu impedancji elektrycznej jednostkowej $|Z_1|$ trzonu modelowej kości długiej osteoporotycznej okazała się względnie stała wzdłuż długości trzonu kości i wynosiła ok. 670 Ω/cm dla częstotliwości 100 Hz oraz ok. 630 Ω/cm dla częstotliwości 10 kHz; lokalne odchylenie poniżej wartości średniej modułu tej impedancji może być spowodowane obecnością w tym miejscu przyczepu mięśnia szkieletowego oraz lokalnym rozciąganiem materiału fazy stałej kości przez aktywny mięsień, co skutkuje lokalną zmianą wewnętrznej struktury kostnej.

Otrzymane pilotażowe wyniki doświadczalnego badania właściwości strukturalno-elektrycznych trzonów kości długich w stanie patologicznym wymagają potwierdzenia w pełnym badaniu doświadczalnym na większej ilości modelowych kości długich osteoporotycznych (oraz nie w pełni zmineralizowanych), obejmującym również ilościową ocenę wewnętrznej struktury badanych próbek trzonowo-kostnych (m.in. określenie względnej objętości materiału fazy stałej tych próbek, ich porowatości, itd.) w celu doświadczalnego określenia ilościowej zależności pomiędzy właściwościami strukturalno-elektrycznymi trzonów kości długich a ich gęstością/porowatością – pod kątem patentowanej nieinwazyjnej metody wyznaczania gęstości i parametrów porosprężystych kości długich prawidłowych i osteoporotycznych [20,21].

Podziękowania

Praca finansowana w ramach badań statutowych Wydziału Matematyki, Fizyki i Techniki Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy.

In order to verify the working research hypothesis stated above, we are planning to carry out a full experimental study of the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological state (on a larger number of model long bones), including also a direct examination of the internal structure of bone shaft samples, i.e. a determination of the relative volume of the solid phase material of these bone samples.

With known values of the parameters of the internal structure of bone shaft samples, it will be possible to appropriately interpret the results of measurements of the unit electrical impedance modulus values of long bone shafts. This will allow us to quantitatively determine the existing relationship between the electrical properties of long bone shafts and the parameters of bone structure.

Final results

On the basis of an experimental comparative analysis of the kinetics of bone preparation processes, we can propose biomaterial experimental models of the long bones in a pathological stage: deproteinization using a 7% solution of hydrogen peroxide (H_2O_2) to produce a model of bone in a state of reduced osteogenesis and decalcification with 0.5 M hydrochloric acid (HCl) to produce a model of insufficiently mineralized bone.

Having concluded the pilot experimental evaluation of the structural-electrical properties in a low frequency range (20 Hz to 10 kHz) of the model long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state, it can be stated that:

1) The values of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ [Ω/cm] of the bone shaft of the model osteoporotic long bone decrease very clearly as a function of frequency in the range from 20 Hz to ca. 2 kHz; from the frequency 500 Hz to 2 kHz, the changes in the $|Z_1|$ value are small, and above 2 kHz the $|Z_1|$ value practically does not depend on frequency changes.

2) The mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ of the bone shaft of the model osteoporotic long bone was found to be relatively constant along the length of the bone shaft and was about 670 Ω/cm at a frequency of 100 Hz and about 630 Ω/cm at a frequency of 10 kHz; a local decrease below the mean value of the modulus of the unit electrical impedance $|Z_1|$ of bone (femur) shaft may be caused by the presence of the skeletal muscle attachment at this site and the stretching of the solid phase material of bone by this muscle, which results in a local change in the bone's internal structure.

The experimental results of the preliminary study on the structural-electrical properties of long bone shafts in a pathological (osteoporotic) state require confirmation in a full experimental study performed on a larger number of model osteoporotic long bones (and also on incompletely mineralized bones), also including a quantitative assessment of the internal structure of examined bone shaft samples (i.e. determination of the relative volume of solid phase material in bone shaft samples, their porosity, etc.) in order to determine experimentally the quantitative relationship between the structural-electrical properties of long bone shafts and their density/porosity in the context of a patented non-invasive method for the determination of the density and poroelastic parameters of normal and osteoporotic long bones [20,21].

Acknowledgements

This work was supported by the statutory research fund of the Faculty of Mathematics, Physics and Technology, the Casimir the Great University in Bydgoszcz (Poland).

- [1] Brighton C.T., Wang W., Seldes R., Guihong G., Pollack R.: Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *Journal of Bone and Joint Surgery* 83A(10) (2001) 1514-1523.
- [2] Uklejewski R.: O efektach elektromechanicznych w porowatej kości zbitiej wypełnionej płynem fizjologicznym i efekcie akustoelektrycznym w trzonach kości długich mokrych, /rozprawa habili. s.203/. Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej PAN. Wyd. IBIB PAN Nr 35 Warszawa 1994.
- [3] Sierpowska J., Lammi M.J., Hakulinen M.A., Jurvelin J.S., Lappalainen R., Töyräs J.: Effect of human trabecular bone composition on its electrical properties. *Medical Engineering & Physics* 29(8) (2007) 845-852.
- [4] Sierpowska J., Töyräs J., Hakulinen M.A., Saarakala S., Jurvelin J.S., Lappalainen R.: Electrical and dielectric properties of bovine trabecular bone relationships with mechanical properties and mineral density, *Physics in Medicine and Biology* 48 (2003) 775-786.
- [5] Sierpowska J., Hakulinen M.A., Töyräs J., Day J.S., Weinans H., Jurvelin J.S., Lappalainen R.: Interrelationships between electrical properties and microstructure of human trabecular bone, *Physiological Measurement* 51(20) (2006) 5289-5303.
- [6] De Mercato G., García Sánchez F.J.: Variation of the electric properties along the diaphysis of bovine femoral bone. *Medical & Biological Engineering & Computing* 29(4) (1991) 441-446.
- [7] Meaney P.M., Zhou T., Goodwin D., Golnabi A., Attardo E.A., Paulsen K.D.: Bone Dielectric Property Variation as a Function of Mineralization at Microwave Frequencies, *International Journal of Biomedical Imaging* 2012 (2012):649612 doi: 10.1155/2012/649612.
- [8] Kosterich J.D., Foster K.R., Pollack S.R.: Dielectric properties of fluid-saturated bone – the effect of variation in conductivity of immersion fluid. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 31(4) (1984) 369-374.
- [9] Chakkalakal D.A., Johnson M.W.: Electrical properties of compact bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 161 (1981) 133-145.
- [10] Chakkalakal D.A.: Electrical conductivity of compact bone in vitro. *Proceedings of Society for Biomaterials 8th Annual Meeting* (1982) 15.
- [11] Black J., Mattson R.U.: Relationship between porosity and mineralization in the Haversian osteon. *Calcified Tissue International* 34 (1982) 332-336.
- [12] Kosterich J.D., Foster K.R., Pollack S.R.: Dielectric permittivity and electrical conductivity of fluid saturated bone. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 30 (1983) 81-86.
- [13] Chakkalakal D.A., Johnson M.W., Harper R.A., Katz J.L.: Dielectric properties of fluid-saturated bone. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 27 (1980) 95-100.
- [14] Uklejewski R., Czapski T.: Drobot's algebraic theory of dimensional analysis in construction of system of mechoelectric analogies. Application to the problems of acoustoelectric waves propagation in porous long bones. *PAMM* 4(1) (2004) 588-589.
- [15] Uklejewski R., Czapski T.: Modele obwodowy i obliczeniowy przenoszenia drgań sprężystych w kościach długich wraz z towarzyszącymi napięciami i prądami elektrycznymi – wstępne symulacje komputerowe. *Materiały XI Konferencji Naukowej „Zastosowanie Komputerów w Elektrotechnice ZKwE' 2006”* (2006) 203-204.
- [16] Czapski T.: Analiza parametryczna dla procesu generowania potencjałów elektrycznych towarzyszących przenoszeniu podłużnych drgań w kościach długich prawidłowych i osteoporotycznych. *Materiały XII Konferencji „Zastosowanie Komputerów w Elektrotechnice ZkwE'2007”*, (2007) 125-126.
- [17] Czapski T.: Modelowanie i komputerowa analiza elektrokustycznych zjawisk w kościach długich prawidłowych i osteoporotycznych, PhD Thesis, Poznan University of Technology, Faculty of Electrical Engineering, Poznan (2008).
- [18] Uklejewski R., Czapski T.: Computational Analysis of Strain Generated Potentials (SGPs) associated with Transmission of Acousto-Elastic Vibrations in Normal and Osteoporotic Long Bones. *International Conference of the Polish Society of Biomechanics “Biomechanics 2010”* (2010) 239-240.

- [19] Uklejewski R., Czapski T.: Electric Transmission Line Approach to Non-Electric Transmission Lines. In: *Transmission Lines: Theory, Types and Applications* (Ed.: Welton D.M.). ISBN: 978-1-61761-300-5, Nova Science Publishers, USA, 2010.
- [20] Zgłoszenie patentowe nr P382344 w UP RP: Sposób nieinwazyjnego określania gęstości i parametrów porosprężystych kości długiej, autorzy wynalazku: Uklejewski R., Czapski T. /w trakcie procedury patentowej/.
- [21] Patent application No. Euro-PCT/PL2008/000032 in European Patent Office: Uklejewski R., Czapski T., A method of the non-invasive determination of density and poroelasticity parameters of the long bone /actually patented in EPO in Munich/.
- [22] Bertazzo S., Bertran C.A.: Effect of hydrazine deproteinization on bone mineral phase: a critical view. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102 (2008) 137-145.
- [23] Castro-Ceseña A.B., Novitskaya E.E., Chen P., del Pilar Sánchez-Saavedra M., Hirata G.A., McKittrick J.: Comparison of demineralized and deproteinized bone, *Materials Research Society Proceedings* 1301 (2011) DOI: <http://dx.doi.org/10.1557/opl.2011.194>.
- [24] Chen P.Y., McKittrick J.: Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4 (2011) 961-973.
- [25] Chen P.Y., Toroian D., Price P.A., McKittrick J.: Minerals form a continuum phase in mature cancellous bone, *Calcified Tissue International* 88 (2011) 351-361.
- [26] Hui-fen X., Hui-yu H., Xiao-xue T, Jie C.: Biocompatibility of xenogenic bone materials prepared by different ways. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 15(47) (2011) 8749-8752.
- [27] Bowman S.M., Zeind J., Gibson L.J., Hayes W.C., McMahon T.A.: The tensile behavior of demineralized bovine cortical bone. *Journal of Biomechanics* 29 (1996) 1497-1501.
- [28] Castro-Ceseña A.B., Novitskaya E.E., Chen P., Hirata G.A., McKittrick J.: Kinetic studies of bone demineralization at different HCl concentrations and temperatures, *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 523-530.
- [29] Figueiredo M., Cunha S., Martins G., Freitas J., Judas F., Figueiredo H.: Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design* 89 (2001) 116-124.
- [30] Lewandrowski K.U., Tomford W.W., Michaud N.A., Schomacker K.T., Deutsch T.F.: An electron microscopic study on the process of acid demineralization of cortical bone. *Calcified Tissue International* 61 (1997) 294-297.
- [31] Lewandrowski K.U., Venugopalan V., Tomford W.W., Schomacker K.T., Mankin H.J., Deutsch T.F.: Kinetics of cortical bone demineralization: controlled demineralization - a new method for modifying cortical bone allografts. *Journal of Biomedical Materials Research* 31 (1996) 365-372.
- [32] Tinling S.P., Giberson R.T., Kullar R.S.: Microwave exposure increases bone demineralization rate independent of temperature. *Journal of Microscopy* 215 (2004) 230-235.
- [33] Suvarna K., Layton C., Bancroft J.: *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7th Edition. New York: Churchill Livingstone, 2013.
- [34] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275.
- [35] Rosen A.D.: End-point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. *Stain Technology* 56 (1981) 48-49.