

## WPŁYW ZAWARTOŚCI WAPNIA I FOSFORU PASZOWEGO NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE TKANKI KOSTNEJ

ANNA NIKODEM<sup>1\*</sup>, ZBIGNIEW DOBRZAŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,  
ZAKŁAD INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ I MECHANIKI EKSPERYMENTAL-  
NEJ,  
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLSKA;  
<sup>2</sup> UNIWERSYTET PRZYRODNICZY,  
ZAKŁAD HIGIENY ZWIERZĄT I DOBROSTANU ZWIERZĄT,  
UL. KOŻUCHOWSKA 5, 51-631 WROCŁAW, POLSKA  
\*E-MAIL: ANNA.NIKODEM@PWR.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 109-111, (2011), 78-80]

### Wprowadzenie i cel pracy

Funkcjonowanie tak złożonej struktury, jaką jest układ kostny człowieka, możliwe jest dzięki odpowiedniej budowie i właściwościom tkanki kostnej. Zapewnienie wystarczającej wytrzymałości przy zachowaniu minimalnej masy, niezbędnej podatności i zdolności przenoszenia obciążeń, możliwe jest tylko dzięki optymalnemu połączeniu różnych składników tkanki kostnej, których cechy wzajemnie się uzupełniają. Tkanka kostna, dzięki swojej budowie jest materiałem, który cały czas dostosowuje swoje właściwości mechaniczne i strukturalne reagując na najmniejszą nawet zmianę w warunkach obciążenia [6]. Z jednej strony, z uwagi na takie cechy jak kruchość i sztywność tkanka kostna zaliczana jest do materiałów ceramicznych [2], z drugiej natomiast strony włókna kolagenowe nadają jej swoistą sprężystość. Z tego też względu, tkankę kostną należy rozpatrywać jako dwufazowy materiał kompozytowy, składający się z macierzy kolagenowej o niskim module sprężystości, w której „zatonione są” kryształy hydroksyapatytu HA o wysokim module sprężystości [7].

Włókna kolagenowe zawierają głównie kolagen typu I, który uczestniczy w najważniejszych procesach budowy i przebudowy tkanki kostnej, takich jak proces tworzenia kości, jej mineralizacja oraz uzyskiwanie prawidłowych właściwości mechanicznych. Wzdłuż włókien kolagenu odkładane są związki nieorganiczne, kryształy hydroksyapatytu, jony węglanowe i fosforanowe. Głównymi składnikami mineralnymi tych kryształów jest wapń i fosfor [5].

Na stopień strawności związków fosforowych wpływa wiele czynników, do których zalicza się m.in. rodzaj paszy, gatunek i rasę zwierząt, zawartość witamin i probiotyków oraz stosunek Ca:P i innych składników odżywczych. Podstawową paszą używaną w żywieniu świń jest ziarno zbóż, które jest jednocześnie głównym źródłem fosforu, występującym w formie fitynianów. Fosfor, w formie fitynianów jest bardzo trudno przyswajalny przez organizm. Cząsteczki kwasu fitynowego cechują się wysokim potencjałem chelatującym, co powoduje, iż przy neutralnym pH tworzą trudno rozpuszczalne kompleksy z aminokwasami, cukrami oraz dwuwartościowymi kationami metali powodując zmniejszenie ich absorpcji w organizmie. Dodatek egzogennej fitazy mikrobiologicznej do mieszanek paszowych dla trzody powoduje nie tylko wzrost dostępności fosforu, lecz zwiększa także biodostępność wapnia, nawet do 32% [1], oraz wykazuje pozytywne działanie na procesy mineralizacji tkanki kostnej [8].

## INFLUENCE OF CALCIUM CONTENT IN FEED PHOSPHATE ON MECHANICAL PROPERTIES OF BONE TISSUE

ANNA NIKODEM<sup>1\*</sup>, ZBIGNIEW DOBRZAŃSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,  
DIVISION OF BIOMEDICAL ENGINEERING AND EXPERIMENTAL  
MECHANICS,  
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW, POLAND  
<sup>2</sup> WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES,  
DEPARTMENT OF ANIMAL HYGIENE AND ANIMAL WELFARE,  
5 KOŻUCHOWSKA STR., 51-631 WROCŁAW, POLAND  
\*E-MAIL: ANNA.NIKODEM@PWR.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 109-111, (2011), 78-80]

### Introduction and purpose of study

The operation of the highly complex structure such as the human skeletal system is possible by the appropriate construction and properties of bone tissue. Sufficient strength while maintaining minimum mass, necessary resilience, and ability to transfer loads can only be assured by the optimum connection of various bone tissue components, whose features are mutually complementary. Bone tissue, due to its design, is a material that continuously adapts its mechanical properties and structural response to the smallest change in load condition [6]. On the one hand, due to brittles and stiffness properties, bone tissue is considered to be ceramics [2] but, at the same time the collagen fibers give it elasticity. Therefore, the bone should be viewed as a two-phase composite material, consisting of a collagen matrix with low elasticity and HA hydroxyapatite crystals with high elasticity modulus [7].

Collagen fibers consist mainly of collagen type I, which play important role in processes of modeling and remodeling of bone tissue during bone formation and mineralization as well as when it achieves proper mechanical properties. Along the collagen fibers inorganic compounds, crystals of hydroxyapatite, carbonate ions and phosphate are accumulated. The main mineral components of these crystals are calcium and phosphorus [5].

The degree of digestibility of phosphorus compounds is affected by many factors, which include, type of feed, breed and species of animals, amount of vitamins and probiotics, and the ratio of Ca vs. P and other nutrients. The primary feed used in pig feeding is grain, which is also the main source of phosphorus that has in the form of phytate. This form of phosphorus is very difficult absorb as molecules of phytic acid are characterized by high chelating potential. Consequently, in neutral pH phytate forms sparingly soluble complexes with amino acids, sugars and divalent metal cations, thus reducing its absorption. Addition of exogenous microbial phytase as a compound of feed for cattle not only increases the availability of phosphorus, but also increases the bioavailability of calcium, even up to 32% [1]. Moreover it is beneficial to bone mineralization processes [8].

Amount of phosphorus supplied with the feed, even when supplemented by microbial phytase, does not cover the requirements of extensively growing pigs. Therefore, there are a number of commercial products which are intended to supplement deficiencies in calcium and phosphorus. The most frequently used phosphate are one, two and tricalcium, calcium-sodium, sodium-calcium-magnesium

Ilość fosforu dostarczana z paszą, nawet po jej uzupełnieniu paszy fitazą mikrobiologiczną, jednak nie pokrywa potrzeb intensywnie rosnących świń. Na rynku pasz istnieje szereg produktów, które mają za zadanie uzupełnić niedobory wapnia i fosforu, do najczęściej stosowanych należą fosforany: jedno, dwu i trójwapniowe, wapniowo-sodowe, sodowo-wapniowo-magnezowe i amonowe. Badania wykazują że najlepsze efekty żywieniowe u świń uzyskuje się stosując fosforan jedno lub dwusodowy [3]. Oczywiście nie wystarczy tylko wprowadzić dużą ilość danego związku do pokarmu, ważne jest aby ten związek został prawidłowo wchłonięty i wykorzystany przez organizm. Z tego powodu, w przypadku pasz, coraz częściej poszukuje się związków umożliwiających zwiększenie absorpcji wapnia i fosforu z pożywienia bez zmiany w wydalanej ilości. Dlatego też, konieczne staje się wprowadzanie specjalnych pasz uzupełnionych o niezbędną ilość fosforu mineralnego [1]. Pytaniem pozostaje jednak wciąż: czy zwiększona przyswajalność fosforu przez organizm spowoduje jego wyższy poziom w tkance kostnej? oraz czy wyższy poziom tego pierwiastka spowoduje wzrost wytrzymałości samej tkanki kostnej?

Głównym celem prezentowanych badań było określenie właściwości mechanicznych oraz zawartości pierwiastkowej tkanki kostnej pochodzącej od świń, karmionych paszą o zróżnicowanej zawartości wapnia i fosforu. Dodatkowo, badania miały na celu określenie wartości paszowej nowego fosforanu dwuwapniowego (n-DCP), wyprodukowanego przez Gdańskie Zakłady Nawozów Fosforowych „Fosfory” Sp.z.o.o. zgodnie z patentem No P-369805 i porównaniu go do innych uznanych na rynku, fosforanów jednowapniowego oraz wapniowo-sodowego.

## Material i metoda

Materiałem do badań były nasady bliższe kości udowych (N=24) młodych warchlaków, przygotowane w Zakładzie Doświadczalnym Żywności Zwierząt Gorzyń (tucz 87 dni [4]). Ze względu na rodzaj zastosowanej paszy, materiał podzielono na trzy grupy pomiarowe: grupa I – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu jednowapniowego (MCP); grupa II – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu dwuwapniowego (n-DCP) oraz grupa III – osobniki karmione mieszanką z udziałem fosforanu wapniowo-sodowego (grupa kontrolna CNP). Badania podzielono na kilka etapów, pierwszym z nich było przygotowanie sześciennych próbek o wymiarach 10x10x10 mm z tkanki gąbczastej głowy i krętarza większego (n=180) kości udowej oraz prostopadłościennych o wymiarach 4x4x20 mm z tkanki zbitiej trzonu kości udowej (n=90).

Właściwości mechaniczne tkanki kostnej określono w teście jednoosiowego ściskania na stanowisku obciążeniowym wykorzystując maszyny MTS 858 MiniBionix, dodatkowo dla każdej z próbek tkanki zbitiej określono wartość mikrotwardości Vickersa. Pomiarów wykonano za pomocą mikrotwardościomierza HMV Micro Hardness Tester Shimadzu®, zgodnie z normą PN-EN ISO 6507-1 (RYS. 3 i 4).

## Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują iż najwyższe wartości parametrów mechanicznych takich jak wytrzymałość i moduł Young'a otrzymano dla II grupy pomiarowej, czyli dla osobników karmionych przyżyciowo paszą o podwójnej zawartości wapnia. Spowodowało to odkładanie tego pierwiastka w obrębie tkanki zbitiej (korowej), jednak nie w tkance gąbczastej, gdzie poziom wapnia był podobny we wszystkich grupach pomiarowych. Dla tkanki zbitiej zaobserwowano, w związku z tym najwyższe wartości wskaźników mecha-

and ammonium. Studies in literature present that the best results in swine nutrition is obtained when one or disodium phosphate is used [3]. Obviously, adding a large amount of the extra compounds into the food is not enough. It is also important that this compound is properly absorbed and utilized by the body. For this reason, in the case of feed, we are investigating the proper amounts of additional compounds that will increase absorption of calcium and phosphorus from the forage without changing the amount that is excreted. Therefore, it becomes necessary to use specific forage supplemented with the properly adjusted quantity of mineral phosphorus [1].

Another question that has to be answered is whether the additional, assimilated amount of phosphorus will increase its concentration in bones. Also whether the higher concentration will lead to improvement in structural and mechanical properties of bone? The main goal of this study was to determine the mechanical properties and elemental content of bone tissue derived from pigs fed with forage with different amounts of calcium and phosphorus. In addition, the study was to determine the fodder value of the new dicalcium phosphate feed (n-DCP) produced by the Gdańsk Phosphate Fertilizer Plants' Fosfory "Ltd. according to patent No. P-369805, when compared to other feeds recognized in the market - monocalcium phosphate, calcium and sodium.

## Material and methods

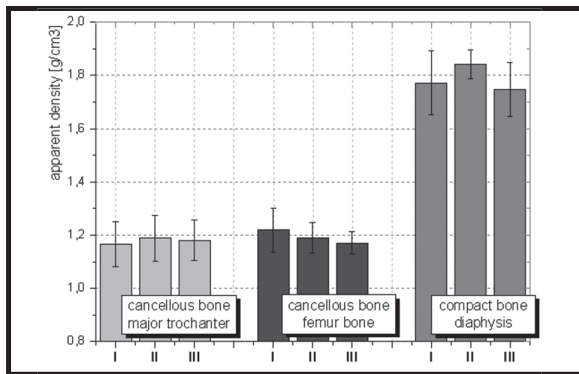
The experimental material consists of epiphysis of femur bone (N = 24) of young piglets, prepared in the Experimental Animal Feeding Company Gorzyń (fattening for 87 days [4]). Due to the type of feed used in experiments, the material was divided into three test groups: Group I - animals fed a supplement of monocalcium phosphate (MCP), Group II - animals fed with a supplement of dicalcium phosphate (n-DCP) and Group III - animals fed with a supplement of calcium-sodium phosphate (control group CNP). The study was divided into several stages, the first stage was to prepare cubic specimens with dimensions of 10x10x10 [mm] from the cancellous tissue of the head and greater trochanter (n=180) of femur and rectangular with dimensions of 4x4x20 [mm] of compact tissue of the femoral diaphysis (n=90).

The mechanical properties of bone were investigated using uniaxial compression test with testing machine MTS 858 MiniBionix. Additionally, for each of the compact tissue samples the value of the Vickers microhardness, were estimated. Measurements were performed using microhardness Micro Hardness Tester HMV® Shimadzu, according to PN-EN ISO 6507-1 (FIG. 3 and 4).

## Results and discussion

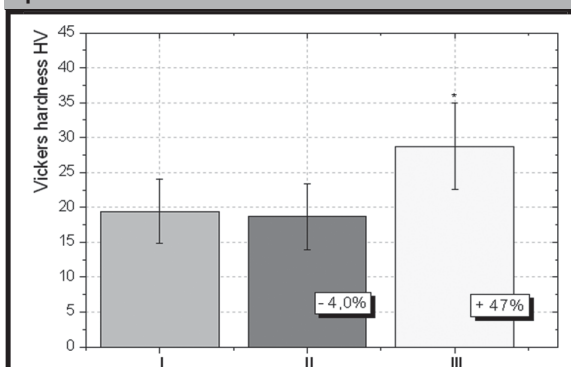
Results indicate that the highest values of mechanical parameters (i.e. strength and Young's modulus) were obtained for measurement of group II, which was fed with supplement of double calcium content. This result is a consequence of accumulation of calcium in compact bone tissue, but not in the cancellous bone tissue where the concentration of calcium was similar for all the groups. For the compact bone tissue we have observed, higher values of mechanical properties and change in the nature of the tissue that appeared to be more brittle (FIG. 2).

Samples from the group II have the highest value of density while values of microhardness HV (FIG. 3) was the lowest. On the other hand, samples from the group III had the lowest density and the highest density. The results obtained from present study show, that dense material does



**RYS. 1.** Wartości gęstości fizycznej tkanki kostnej gąbczastej oraz zbitiej dla próbek kostnych trzech grup pomiarowych I-III.

**FIG. 1.** Values of the apparent density for cancellous and compact specimens for each of the feeding groups I-III.



**RYS. 3.** Średnie wartości mikrotwardości Vickersa HV uzyskane dla próbek tkanki kostnej zbitiej młodych świni, dla każdej z trzech badanych grup.

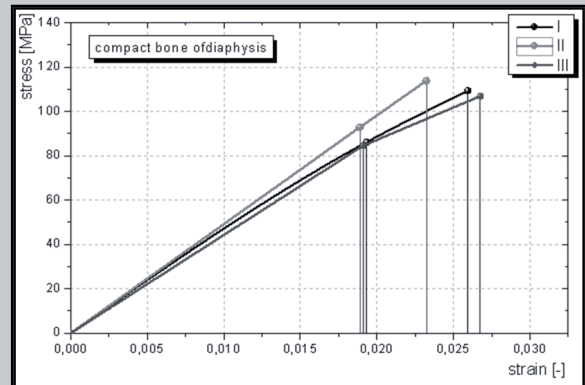
**FIG. 3** Average values of hardness (Vickers HV), calculated for samples of compact bone from three groups of young pigs.

nicznych oraz zmianę charakteru próbek tej tkanki na bardziej kruchej (RYS. 2).

Najwyższą wartością gęstości (RYS. 3) chociaż najmniejszą wartością mikrotwardości HV (Rys. 3) charakteryzują się próbki grupy II, natomiast najmniejszą gęstością a jednocześnie największą mikrotwardości próbki grupy III. Z uzyskanych rezultatów wynika zatem, iż gęsty nie oznacza od razu wytrzymały, dlatego też w końcowym etapie badań, określono stopień mineralizacji tkanki kostnej na podstawie widm uzyskanych z wykorzystaniem spektroskopii Ramana. Otrzymane wyniki wskazują, iż stopień mineralizacji tkanki kostnej jest odwrotnie proporcjonalny do twardości tkanki kostnej.

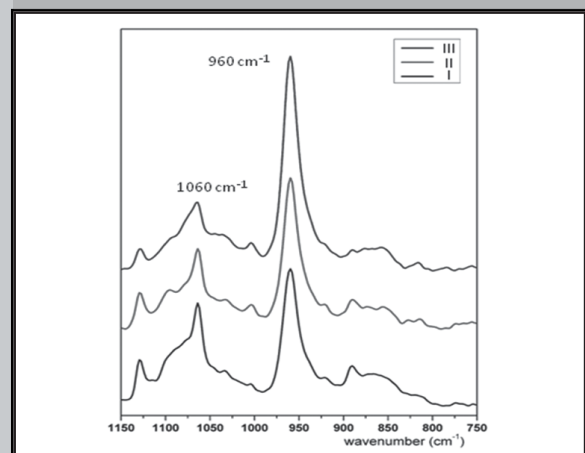
## Piśmiennictwo

- [1] Augspurger N. R., Baker D. H., Phytase improves dietary calcium utilization in chicks, and oyster shell, carbonate, citrate, and citrate-malate forms of calcium are equally bioavailable, *Nutrition Research*. 2004; 24: 293-301.
- [2] Jackson, S., Cartwright, A.g. & Lewis, D., The morphology of bone minerals crystals. *Calcif. Tissue Res*. 1978; 25:217-222.
- [3] Jongbloed A.w., Mroz Z., Van Der Weij-jongbloed R., Kemme P.a. The effects of microbial phytase, organic acids and their interaction in diets for growing pigs. *Liv. Prod. Sci.*; 2000, 67: 113-122.
- [4] Korniewicz D., Kołacz R., Dobrzański Z., Korniewicz A., Kulok M., Effect of dietary halloysite on the quality of feed and utilization of nutrients by fatteners. *EJPAU* 2006; 9(4), #59.



**RYS. 2.** Średnie charakterystyki odkształcenie-napięcie uzyskane w próbie jednoosiowego ściskania tkanki zbitiej trzech grup pomiarowych.

**FIG. 2.** Stress-strain characteristics of compact tissue samples from diaphysis samples for each of the feeding groups I-III.



**RYS. 4.** Fragmenty widma Ramana dla przykładowych próbek każdej z trzech grup żywieniowych.

**FIG. 4.** Comparison of examples of Raman spectra obtained for each of the feeding groups I-III.

not mean robustness, and therefore in the final stage of the study, the degree of mineralization of bone tissue was determined from spectra obtained using Raman spectroscopy. The results show that the degree of mineralization of bone tissue is inversely proportional to the hardness of bone tissue.

## References

- [5] Kuroпка P., Kuryszko J., Mazurkiewicz-Iyczewska S., Mineralizacja tkanki kostnej. *Medycyna Wet.* 2006; 62 (5): 557-559.
- [6] Nikodem A., Ściagała K., Impact of some external factors on the values of mechanical parameters determined in tests on bone tissue. *Acta of Bioengineering and Biomechanics* 2010; 12(3): 85-93.
- [7] Uklejewski R., Winiecki M., Rogala P, Zgodność strukturalno-adaptacyjna połączeń kości z porowatymi implantami na podstawie tradycyjnego jednofazowego i współczesnego dwufazowego porospężystego modelu biomechanicznego tkanki kostnej. *Engineering of Biomaterials*, 2006; 1-13: 54-55.
- [8] Tanveer A., Shahid R., Muhammad S., Ahsan-ul H., Zia-ul H., Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler.