

MECHANIZM REGENERACJI TKANKI KOSTNEJ PO IMPLANTACJI KOMPOZYTU Z POLIMERU RESORBOWALNEGO MODYFIKOWANEGO HYDROKSYAPATYTEM

JAN CHŁOPEK, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, PATRYCJA ROSÓŁ

AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30 – 059 KRAKÓW
E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Implanty kompozytowe z kopolimeru resorbowalnego laktynu z glikolidem modyfikowanego nanocząstkami hydroksyapatytu oraz implanty z czystego polimeru wszczepiono w kość zuchwy królika. Okresy kontrolne spadały po 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 tygodniach implantacji. Przeprowadzono obserwację mikroskopową granicy kość-implant wraz z analizą pierwiastków przy użyciu mikroskopu skaningowego (SEM) z przystawką EDS. Zaobserwowano, że po implantacji czystego polimeru udział tkanki łącznej jest większy niż w przypadku PGLA+HAP w całym okresie obserwacji. W przypadku kompozytu widoczne są dwa mechanizmy odbudowy kości, zarówno na cząstkach hydroksyapatytu jak i na wytworzonych włóknach kolagenowych.

[Inżynieria Biomateriałów, 58-60,(2006),98-101]

Wprowadzenie

Modyfikacja polimerów resorbowalnych nanocząstkami hydroksyapatytu daje możliwość opracowania wielofunkcyjnych implantów kompozytowych dla chirurgii kostnej. Poliester alifatyczny (PLA, PGA) i ich kopolimery ulegają w środowisku biologicznym hydrolizie do poszczególnych kwasów (kwas mlekowy, kwas glikolowy), które następnie wchodzi w cykl przemian enzymatycznych (cykl Krebsa), w wyniku czego są wydalane z organizmu w postaci dwutlenku węgla i wody [1]. Istotne jest, aby czas resorpcji polimeru był dostosowany do czasu regeneracji leczonej tkanki. Osnowa polimerowa ulegając stopniowej resorpcji powoduje obniżenie wytrzymałości implantu, co powinno umożliwić przejmowanie obciążeń przez leczoną tkankę. Dodatek nanocząstek hydroksyapatytu ma na celu aktywowanie wydzielania apatytu kostnego i stymulowanie wzrostu tkanki kostnej. Zastosowanie cząstek o nanometrycznych rozmiarach powinno zwiększyć ich bioaktywność, co jest związane z dużym rozwinięciem powierzchni tego materiału. Nanocząstki sprzyjają również pozytywnej odpowiedzi komórkowej ze względu na ich zbliżone wymiary [2].

Do określenia wzajemnych oddziaływań implant-tkanka konieczne jest przeprowadzenie badań biologicznych na zwierzętach. Pozwalają one ocenić zmiany zachodzące w implancie pod wpływem wielu czynników równocześnie (działania enzymów, adhezji białek i komórek, zróżnicowanego stanu naprężeń, zmieniającej się w stanach chorobowych bądź zapalnych temperatury i pH). Przede wszystkim jednak pozwalają ocenić jakość rosnącej tkanki oraz szybkość i mechanizm procesu gojenia.

Celem pracy jest ocena wpływu środowiska biologicznego na procesy resorpcji polimeru, jak również określenie szybkości i mechanizmu regeneracji leczonej tkanki kostnej.

THE MECHANISM OF BONE TISSUE REGENERATION AFTER IMPLANTATION OF RESORBABLE POLYMER COMPOSITE MODIFIED WITH HYDROXYAPATITE

JAN CHŁOPEK, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ, PATRYCJA ROSÓŁ

AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
CRACOW, POLAND
E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

Abstract

Lactide-co-glycolide/nano-hydroxyapatite composite and pure polymer were implanted into the rabbit submaxilla bones. Control periods were determined as 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 weeks after the implantation. Microscopic observations of bone-implant interface, together with elemental analyses, were performed using the scanning electron microscope (SEM) equipped with EDS unit. It was found that the contribution of connective tissue is higher after pure polymer implantation as compared to PGLA+HAP composite. In the case of composite, two mechanisms of bone reconstruction can be observed, both on hydroxyapatite particles as well as on collagen fibres formed.

[Engineering of Biomaterials, 58-60,(2006),98-101]

Introduction

Modification of resorbable polymers with use of hydroxyapatite nanoparticles opens the opportunities to design multifunctional composite implants for bone surgery. Aliphatic polyesters (PLA, PGA) and their co-polymers undergo hydrolysis in biological environment and break into acids (lactic, glycolic), which later enter the cycle of enzymatic transformations (Krebs' cycle). As the result, they are removed from the body in form of carbon dioxide and water [1]. The adjustment of polymer resorption time to the time of regeneration of healed tissue is critical.

Progressive resorption of polymer matrix leads to implant's strength reduction, which should allow the healed tissue for taking over the carried strains. The addition of hydroxyapatite nanoparticles has for aim the activation of release of bone apatite and stimulation of bone tissue growth. The application of particles of nanometric dimensions shall increase their bioactivity, related to extensive surface development of this material. The presence of nanoparticles favours also the positive cell response, due to their mutual size closeness [2].

Biological examination using animals is necessary in order to establish the mutual implant-tissue interaction. Such experiments enable to assess the changes taking place within the implant, simultaneously affected by the multitude of factors (enzyme action, protein and cell adhesion, differentiated stress, temperature and/or pH varying in inflammation or disease situations). First and foremost such experiments allow for assessment of quality of the growing tissue, the overall velocity of healing process as well as its mechanism.

The aim of this work was to evaluate the effect of biological environment on the process of polymer resorption, and to define the velocity and the mechanism of healed bone tissue regeneration process.

Materiały i metody

W pracy stosowano kopolimer laktydu i glikolidu (PGLA): 84% laktydu i 16% glikolidu ($M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$) wyprodukowany przez Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrze [3]. Kompozyt otrzymano przez dodatek 15% wag. hydroksyapatytu otrzymanego w wyniku ekstrakcji z kości zwierzęcych [4]. Implanty o kształcie cylindrycznym otrzymano metodą wtrysku w temperaturze 180°C .

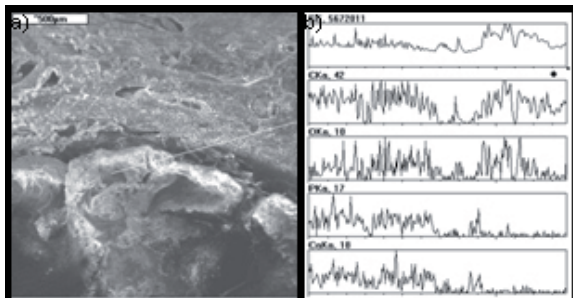
Badania doświadczalne na zwierzętach przeprowadzono na królikach nowozelandzkich. Wszystkie zabiegi prowadzone były w Centralnej Zwierzętarni Śląskiej Akademii Medycznej za zgodą Komisji Bioetycznej. Wszczepy wprowadzono w chirurgicznie przygotowane łożysko o średnicy 3,2 mm w kości żuchwy. Okresy kontrolne wyznaczono na 1,2,3,6,12,24,48 tydzień od implantacji materiału.

Obserwację mikroskopową granicy kość-implant wraz z analizą pierwiastków wykonano na mikroskopie skaningowym (SEM) Jeol JSM-5400 z przystawką EDS.

Wyniki badań i dyskusja

Analiza mikroskopowa wraz z analiza EDS wskazują, że implant wykonany z czystego polimeru separuje się od kości grubą warstwą tkanki łącznej przez cały okres obserwacji (zwiększona zawartość tlenu i węgla w analizie EDS – RYS.1,2,3,4). Tkanka łączna obecna jest w obrębie implantu, co pozwala wnioskować, że zastępuje resorbujący się polimer. Po 24 tygodniach implantacji w miejscu po implantacji, oprócz tkanki łącznej widoczne są również jony wapnia i fosforu świadczące o stopniowym wzroście udziału kości (RYS.3), a po roku implantacji tkanka kostna zaczyna dominować w stosunku do tkanki łącznej (RYS.4). Resorpcja polimeru zauważalna jest już od 3 tygodnia implantacji, co sugerują obecne w implantcie liczne spękania i pory.

Proces resorpcji kompozytu z cząstkami hydroksyapatytu rozpoczyna się podobnie jak w przypadku czystego polimeru. Już po 3 tygodniach implantacji (RYS.5a) granica kość-implant jest nierówna, widoczne są w niej ubytki polimeru, w które wrosła tkanka kostna. Na styku kość-implant obecna jest tkanka łączna, o czym świadczy zwiększona zawartość tlenu i węgla na analizie EDS (RYS.5b). Po 6 tygodniach przebywania implantu w organizmie królika proces resorpcji obejmuje również środek kompozytu, co można wnioskować na podstawie widocznych spękań implantu (RYS.6a). Wzrost udziału jonów wapnia i fosforu (EDS - RYS.6b) w stosunku do analizy pierwiastkowej po 3 tyg. implantacji sugeruje, że w obrębie implantu oprócz cząstek hydroksyapatytu obecny jest również apatyt kostny.



RYS.1. Implant PGLA w kości żuchwy królika po 3 tygodniach implantacji: a) analiza mikroskopowa SEM, b) analiza EDS.

FIG.1. The PGLA implant in rabbit's submaxilla bone after three weeks from implantation: a) microscopic (SEM) analysis, b) EDS analysis.

Materials and methods

The lactide and glycolide co-polymer (PGLA) was used in this work, consisting of 84% of lactide and 16% of glycolide ($M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$), made by the Centre for Polymer Chemistry PAN in Zabrze, Poland [3]. The composite was obtained by addition of 15 wt.% of hydroxyapatite, the latter being extracted from animal bones [4]. Implants of cylindrical shape were obtained by injection at 180°C .

Animal experiments were carried out using the New Zealand rabbits. All surgeries were performed at the Central Animal Farm of Silesian School of Medicine, with permission of Bioethics Commission. Implants were introduced into surgically prepared bed (dia. 3.2 mm) of submaxilla bone. Control periods were determined as 1,2,3,6,12,24,48 weeks after the implantation.

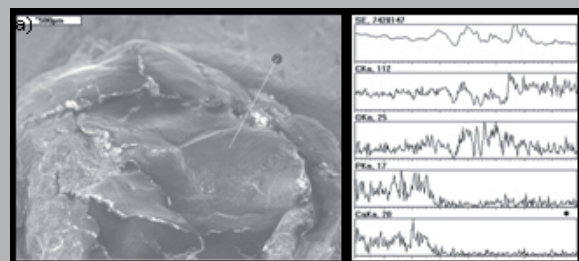
Microscopic observations of bone-implant interface, together with elemental analyses, were performed using the scanning electron microscope (SEM) Jeol JSM-5400 equipped with EDS unit.

Results and discussion:

Microscopic analysis, together with EDS analyses, indicate that the implant made of pure polymer separates itself from the bone by a thick layer of connective tissue during the entire period of observation, which is confirmed by the increased oxygen and carbon dioxide contents in EDS analyses (FIGs.1,2,3,4).

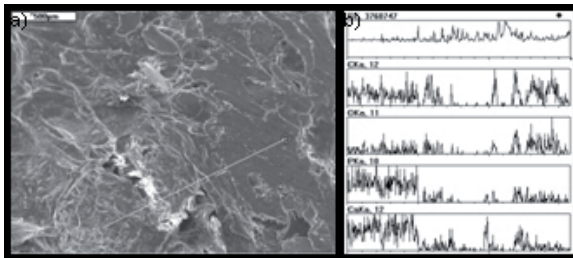
Connective tissue is present within the implant, which allows to conclude that it replaces the resorbing polymer. After 24 hours from implantation, the ions of calcium and phosphorus are present in the implant area, thus proving the increasing contribution of the growing bone (FIG.3). One year after implantation, the content of bone tissue dominates over the connective tissue (FIG.4). Polymer resorption can be observed already three weeks after implantation, which is suggested by the presence of fissures and pores within the implant.

The resorption process of hydroxyapatite containing composite commences in a similar way as in the case of pure polymer. After three weeks from implantation (FIG. 5a) the bone-implant interface becomes rough and polymer losses can be observed with bone tissue in-growths. Connective tissue is present at the bone-implant interface, which is confirmed by the increased content of oxygen and carbon dioxide in the results of EDS analysis (FIG.5b). After the implant remains in rabbit's body for six weeks, the resorption embraces also composite's interior, which can be confirmed by visible cracking of the implant (FIG.6a). Calcium



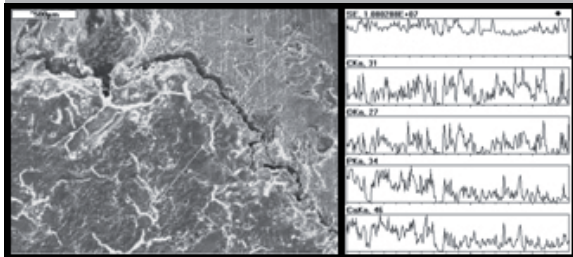
RYS.2. Implant PGLA w kości żuchwy królika po 6 tygodniach implantacji: a) analiza mikroskopowa SEM, b) analiza EDS.

FIG.2. The PGLA implant in rabbit's submaxilla bone after six weeks from implantation: a) microscopic (SEM) analysis, b) EDS analysis.



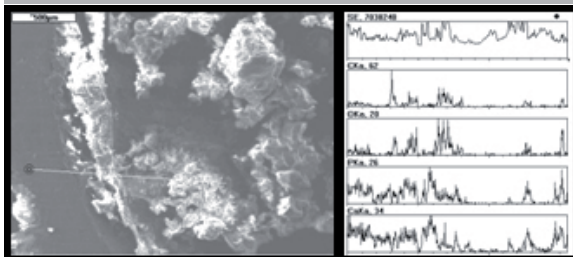
RYS.3. Implant PGLA w kości żuchwy królika po 24 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM i EDS.

FIG.3. The PGLA implant in rabbit's submaxilla bone after 24 weeks from implantation, SEM and EDS analysis.



RYS.5. Implant PGLA+HAP w kości żuchwy królika po 3 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM i EDS.

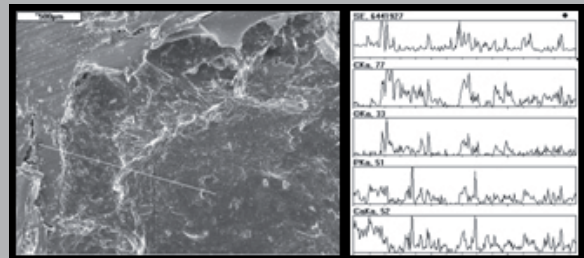
FIG.5. The PGLA+HAP implant in rabbit's submaxilla bone after three weeks from implantation, SEM and EDS analysis.



RYS.7. Implant PGLA+HAP w kości żuchwy królika po 12 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM i EDS.

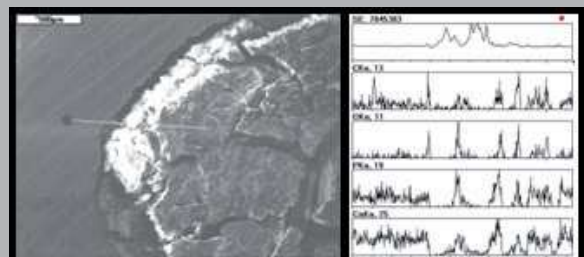
FIG.7. The PGLA+HAP implant in rabbit's submaxilla bone after 12 weeks from implantation, SEM and EDS analysis.

Widoczne jest także zmniejszenie grubości tkanki łącznej na granicy implant-tkanka. Na zdjęciu mikroskopowym otrzymanym po 12 tygodniach implantacji (RYS.7a) widoczne są fraktalne ziarna apatytowe, rozrastające się w puste przestrzenie pozostawione po zresorbowanym polimerze (EDS – RYS.7b). Po roku implantacji puste miejsca są już prawie całkowicie wypełnione tkanką kostną (RYS.8a,b). Na obrazie mikroskopowym widoczne jest również włókno kolagenowe, na powierzchni którego obecne są również wydzielenia apatytu kostnego. Świadczy to o podwójnym mechanizmie tworzenia nowej tkanki kostnej, zarówno na bioaktywnych ziarnach hydroksyapatytowych, jak również na podłożu z włókien kolagenowych.



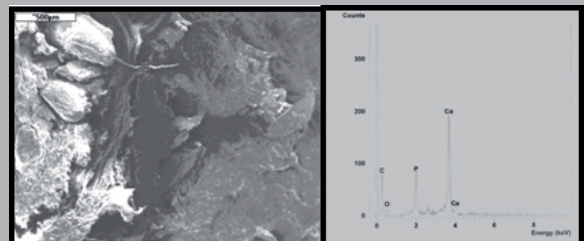
RYS.4. Implant PGLA w kości żuchwy królika po 48 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM, i EDS.

FIG.4. The PGLA implant in rabbit's submaxilla bone after 48 weeks from implantation, SEM and EDS analysis.



RYS.6. Implant PGLA+HAP w kości żuchwy królika po 6 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM i EDS.

FIG.6. The PGLA+HAP implant in rabbit's submaxilla bone after six weeks from implantation, SEM and EDS analysis.



RYS.8. Implant PGLA+HAP w kości żuchwy królika po 48 tygodniach implantacji, analiza mikroskopowa SEM i EDS.

FIG.8. The PGLA+HAP implant in rabbit's submaxilla bone after 48 weeks from implantation, SEM and EDS analysis.

and phosphor ions contents (EDS – FIG.6b) compared to elemental analyses after three weeks from implantation indicate that other than hydroxyapatite, the bone apatite is also present within the implant. Decrease of thickness of connective tissue can be also observed within the implant-tissue interface. The SEM photomicrographs obtained after 12 weeks from implantation (FIG.7a) indicate the presence of fractal apatite grains, growing towards the voids left after the resorbed polymer (EDS – FIG.7b). The voids are almost completely filled by bone tissue after a year from implantation (FIG.8a,b). Photomicrographs reveal also the presence of collagen fibres, with bone apatite secretions on their surfaces. This observation confirms the functioning of dual mechanism of formation of a new bone tissue; both on bioactive hydroxyapatite grains as well as on collagen fibres substrates.

Wnioski

Proces resorpcji zarówno kompozytu PGLA+HAP jak i czystego polimeru jest zauważalny od 3 tygodnia implantacji.

W przypadku kompozytu tworzenie tkanki kostnej następuje równolegle z procesem resorpcji polimeru. Widoczne są dwa mechanizmy odbudowy kości, zarówno na cząstkach hydroksyapatytu jak i na wytworzonych włóknach kolagenowych. Po implantacji czystego polimeru udział tkanki łącznej jest większy niż w przypadku kompozytu PGLA+HAP w całym okresie obserwacji.

Podziękowania

Niniejsza praca stanowi część projektu badawczego: PBZ-KBN-100/T08/2003, oraz projektu 3T08D05228 finansowanych przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Piśmiennictwo

- [1] Błażewicz S., Stoch L., Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Red. Nałęcz M., tom 4, 276-277.
- [2] Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R., Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 2000, 21:1803-10.

POLIMEROWE KOMPOZYTY GRADIENTOWE O KONTROLOWANYM CZASIE RESORPCJI

JAN CHŁOPEK*, BARBARA SZARANIEC*, AGNIESZKA PITAK*, DOROTA WOŁOWSKA-CZAPNIK**, AGNIESZKA SOB CZAK*

*AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30 – 059 KRAKÓW,
**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII I MARKETINGU TEKSTYLIÓW, KATEDRA WŁÓKIEN SZTUCZNYCH, UL. S. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ
E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań „in vitro” resorbowlanych włókien PGLA, PGLA-HAP i alginianowych oraz modyfikowanych nimi błonek kompozytowych z poliglikolilaktidu. Badania te wykazały różnicowane zachowanie zarówno samych włókien resorbowlanych jak i kompozytów z ich udziałem. Na podstawie uzyskanych wyników zaprojektowano i wykonano kompozyty gradientowe o kontrolowanym czasie resorpcji. Zachowanie otrzymanych kompozytów gradientowych w sztucznym środowisku biologicznym przeanalizowano poprzez pomiar prędkości fali ultradźwiękowej przed i po inkubacji w wodzie destylowanej oraz obserwacje mikroskopowe. Tego typu resorbowlane kompozyty gradientowe mogą być wykorzystane na implanty do regeneracji tkanki kostnej, nerwowej i innych tkanek miękkich.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 58-60,(2006),101-106]

Conclusions

The resorption process of both PGLA+HAP composite and pure polymer can be observed during the third week from implantation.

The formation of bone tissue in the case of composite occurs simultaneously with polymer resorption process. Two mechanisms of bone reconstruction can be observed, both on hydroxyapatite particles as well as on collagen fibres formed.

The contribution of connective tissue is higher after pure polymer implantation as compared to the case of PGLA+HAP composite, during the entire observation period.

Acknowledgement

This work was carried out as part of research project: PBZ-KBN-100/T08/2003, financed by the Ministry of Science and Higher Education

References

- [3] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., Nowe możliwości syntezy i zastosowania w medycynie biodegradowalnych kopolimerów glikolidu nie zawierających cyny. *Inż. Biomat.* 2002, 23-25, 27-29.
- [4] Haberko K., Bućko M., Haberko M., Mozgawa W., Pyda A., Zarębski J., Hydroksyapatyt naturalny – preparatyka, właściwości. *Inż. Biomat.* 2003, 30 – 33, 32 – 38.

POLYMER GRADED COMPOSITES WITH CONTROLLED RESORPTION TIME

JAN CHŁOPEK*, BARBARA SZARANIEC*, AGNIESZKA PITAK*, DOROTA WOŁOWSKA-CZAPNIK**, AGNIESZKA SOB CZAK*

*AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS AL. MICKIEWICZA 30, 30-684 KRAKÓW
**TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES, UL. S. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ,
E-MAIL: CHLOPEK@AGH.EDU.PL

Abstract

This paper presents the results of „in vitro” examination of resorbable PGLA, PGLA-HAP and alginate fibres as well as poly(glycol)lactide composite thin foils modified with use of these fibres. The study confirmed different behaviour of fibres and of composites made with their contribution. Based on obtained results the design was proposed and graded composites were manufactured with controlled resorption time. The behaviour of obtained composites was examined in artificial biological environment by measuring the velocity of ultrasonic wave before and after incubation in distilled water, and additionally by microscopic observations. Such resorbable graded composites can be applied as implants in regeneration processes of bone, neural, and other soft tissues.

[*Engineering of Biomaterials*, 58-60,(2006),101-106]