

Piśmiennictwo

[1] Duerig, T.; Pelton, A.; Stöckel, D. "An overview of nitinol medical applications"; *Materials Science and Engineering*: Volume: 273-275, December 15, 1999, pp. 149-160.

[2] Donald L. Wise: "Biomaterials and Bioengineering Handbook": 855-867.

References

[3] S. Mitura, A. Mitura, P. Niedzielski, P. Couvrat: "Nanocrystalline diamond coatings" *Biomaterials*: Volume: 17, Issue: 6, March, 1996, pp. 587-595.

[4] P. Rocher at all.: "Biocorrosion and cytocompatibility assessment of NiTi shape memory alloys" :*Scripta Materialia*: 50 (2004) 255-260.

WPŁYW WYBRANYCH METOD OBRÓBKİ CHEMICZNEJ NA WŁAŚCIWOŚCI STRUKTUR KOSTNYCH

Ostrowska A.*, Kuropka P.***, Będziński R.*, Kuryszko J.**

*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

**AKADEMIA ROLNICZA, UL.KOŹUCHOWSKA 5, 51-631 WROCŁAW
[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 194-196]

THE INFLUENCE OF CHOISING CHEMICAL METHODS TO BONE STRUCTURES PROPERTIES

Ostrowska A.*, Kuropka P.***, Będziński R.*, Kuryszko J.**

*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

**AKADEMIA ROLNICZA, UL.KOŹUCHOWSKA 5, 51-631 WROCŁAW
[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 194-196]

Wprowadzenie i cel pracy

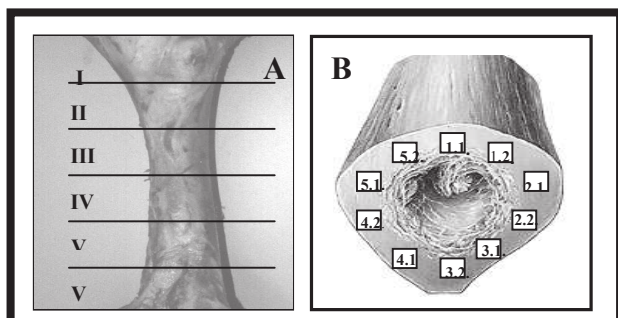
Określenie mechanicznych parametrów tkanki kostnej należy do badań podstawowych, mających duże znaczenie w oszacowaniu prawidłowych relacji sztywności kości-implant. W literaturze dotyczącej tematu, dużo miejsca poświęca się oszacowaniu takich parametrów jak moduł Young'a, wytrzymałość oraz poszukiwaniu korelacji między parametrami mechanicznymi i strukturalnymi. Jednak znaczne różnice, nawet do 400% w wartościach tych parametrów, wymagają coraz to szerszej liczby pomiarów. Różnice te spowodowane są między innymi różnymi technikami pomiarowymi jak i w sposobie przechowywania i przygotowania próbek do badań. Z drugiej strony, tkanka kostna oprócz masy kostnej złożonej z kolagenu i części mineralnej do swojego prawidłowego, fizjologicznego funkcjonowania wymaga dodatkowych struktur takich jak: szpik kostny i naczynia krwionośne. Aby oszacować dokładny udział poszczególnych struktur tworzących tkankę kostną (w szczególności macierzy kostnej) potrzebnym zabiegiem wydaje się być zastosowanie jednej z technik maceracji. Maceracją nazywamy chemiczne usuwanie dodatkowych struktur z tkanki kostnej. W literaturze dotyczącej tematu [1, 2, 3], możemy znaleźć wiele technik maceracji wprowadzonych przez liczne ośrodki w kraju i za granicą. Jednak stosowanie różnych związków chemicznych, w badaniach służących określeniu parametrów mechanicznych, może w istotny sposób zmienić wartości żądanych parametrów. Dlatego też, głównym celem niniejszych badań opisanych w artykule było oszacowanie wpływu wybranych metod maceracji na badane parametry mechaniczne tkanki kostnej.

Introduction and purpose of study

The determination of bone tissue mechanical properties is one of the basic research topic, which has a significant meaning to provide proper relations of bone-implant stiffness. Many papers has been published in which such values like Young's modulus, ultimate strength and also the correlation between mechanical and structural bone properties are requested. However, huge differences in those results, even up to 400%, turns scientists to perform large amounts of tests.. Those differences are caused by different system loading or storage and maceration method using. On the other hand, extra structures such as: bone marrow, blood vessels are required along with bone matrix, composite by collagen and minerals, to fulfil properly all physiological functions. For this reason maceration methods seems to be advisable to determine a real density of bone (especially bone matrix). Maceration we call the resection of all the extra structures, using special chemical solutions. The maceration methods used by many researchers [1, 2, 3] consist of many of techniques. However, each of this methods may induct changes in bone structure and thus affect values of mechanical properties. That is why the main aim of this investigation is to define a influence of maceration methods to mechanical properties values.

Material and methods

Research, was carried out on three bovine femur bone. The investigations were divided into few parts. First, was the tissue sample preparation of dimension 4x4x20 mm (10



RYS. 1. Identyfikacja próbek przygotowanych z kości udowej bukata do testów maceracji. (numer I.5.1 (2) oznacza region, test, numer próbki: 2- próbka poddawana maceracji, 1- próbka referencyjna).

FIG. 1. Identification of bovine femur samples' for maceration tests (number I.5.1 (2) means region, test, number of sample, 2-test sample, 1 is reference sample).

Material i metoda

Materiałem do badań były 3 kości udowe bukata. Badania podzielono na kilka etapów, pierwszym z nich było przygotowanie próbek o wymiarach 4x4x20 mm (obwódowo po 10 próbek - 5 par) z tkanki zbitnej pochodzącej z 6 regionów trzonu kości udowej. Pierwszą próbkę z pary poddawano odpowiedniemu testowi, natomiast druga stanowiła próbkę referencyjną (odniesienia), przy założeniu że wartości parametrów mechanicznych próbek leżących obok siebie, różnią się nieznacznie (maksymalnie do 2%).

Wybrane próbki poddano odpowiednio pięciu metodom maceracji :

1. Kąpiel w wodzie w temperaturze 37°C, czas trwania 24 h
2. Gotowanie w wodzie o temperaturze 100°C, czas trwania 6h
3. Kąpiel w acetonie, czas trwania 24h
4. Kąpiel w acetonie w temperaturze 37°C, czas trwania 24 h
5. Kąpiel w etyleno di-aminie, czas trwania 24h

W celu obserwacji powierzchni, przed i po użyciu każdej z metod maceracji, przeprowadzono badania z użyciem mikroskopu elektronowego typu LEO - Zeiss 435. Do określenia parametrów mechanicznych takich jak: moduł Young'a, wytrzymałość graniczna, granica plastyczności w próbie ściskania osiowego, przy prędkości obciążania 1mm/min, użyto maszyny wytrzymałościowej MTS 858 Mini Bionix.

vertical samples, coupled into pairs) from 6 region compact disphysis femur. The each part, were prepared and marked according to (FIG. 1). The first was a maceration sample and the second was reference sample, under an assumption that mechanical properties of neighbouring samples is similar (we accept maximal difference about 2%).

The samples were subjected to five following maceration tests:

1. The bath in 37°C water, for 24 hour.
2. The boiling in 100°C water, for 6 hour.
3. The bath in acetone ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$) solution, for 24 hour.
4. The bath in 37°C acetone ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$) solution, for 24 hour.
5. The bath in etyleno-di-amine solution, for 10 minute.

To observe sample surface before and after each of maceration methods the microscopic evaluation using scanning electron microscope (SEM) LEO - Zeiss 435 was carry out. To determinate mechanical properties such as: Young's modulus, yield stress and strain, ultimate strength in uniaxial compression test, Material Test System 858 Mini Bionix were used.

Results and discussion

The ultimate strength and Young's modulus results, received from uniaxial compression test, in the TABLE 1 was presented.

As it can be seen from this data, each maceration method has a significant influence on mechanical properties. However, the biggest 19% difference for boiling method was observed. The performed microscopic evaluation shown that the application of boiling in 100°C water cause calcium carbonate accumulation on the outer bone layer (FIG. 2B). The appearance of calcium carbonate crystals may be a reason of calcium outputs from bone matrix and consequently compressive strength reduction.

Acetone solution, which the main role was to resected lipid structures from samples, has additionally dried a bone structure leading to microdamage appeared (FIG. 2C). These microdamages in bone can be responsible for a worsen of mechanical properties.

Application of etyleno-di-amine maceration also affected the bone structure and cause separation of bone layers and thus decreasing results of compressive strength values. The results of this maceration technique shows that higher temperature has a positive changes of mechanical strength.

The results shown that the mechanical properties such Young's modulus and compressive strength significantly depend on direction of preparation sample.

metoda method	E [GPa]		Δ [%]	σ_{\max} [MPa]		Δ [%]
	referencyjna reference	test test sample		referencyjna reference	test test sample	
1	11,38 ± 0,71	11,78 ± 0,5	↑ ~ 3,43	205,39 ± 15,26	218,49 ± 11,93	↑ ~ 6,37
2	11,634 ± 0,94	9,81 ± 0,74	↓ ~ 15,67	214,79 ± 10,17	176,13 ± 15,90	↓ ~ 18
3	11,78 ± 1,1	9,68 ± 0,61	↓ ~ 17,83	205,55 ± 13,24	166,50 ± 18,42	↓ ~ 18,9
4	10,71 ± 0,86	9,98 ± 0,52	↓ ~ 6,78	212,09 ± 9,28	198,30 ± 14,72	↓ ~ 6,5
5	11,27 ± 0,9	10,18 ± 0,78	↓ ~ 9,64	207,15 ± 17,03	186,90 ± 16,36	↓ ~ 9,77

TABELA 1. Wartości parametrów mechanicznych: moduł Young'a i wytrzymałość na ściskanie przed i po zastosowaniu pięciu metod maceracji tkanki kostnej.

TABLE 1. Values of the mechanical properties: Young's modulus and ultimate compressive strength before and after using bone tissue maceration methods.

Wyniki pomiarów wytrzymałości i modułu sprężystości wzdłużnej (Young'a) otrzymane w próbie jednoosiowego ściskania przedstawiono w TABELI 1.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż każda z zaproponowanych metod maceracji ma duży wpływ na wartości parametrów mechanicznych, jednak największy bo aż 19% spadek w wartościach zaobserwowano przy użyciu acetonu, którego główną rolą było usunięcie tłuszczowych części organicznych. Jak wynika z analizy mikroskopowej stan ten może być wynikiem nadmiernego wysuszenia (przesuszenia) tkanki kostnej, czego skutkiem są pojawiające się mikropęknięcia obserwowane na powierzchni próbki (RYS. 2C). Inicjacja mikropęknięć w wyniku zastosowania tej metody przygotowania próbek, powoduje obniżoną, w stosunku do próbki referencyjnej, wytrzymałość na ściskanie. Również dla próbek gotowanych, zaobserwowano znaczny bo aż 18% spadek w wartościach parametrów mechanicznych. Z przeprowadzonej analizy mikroskopowej wynika, iż w tym przypadku na powierzchni próbki zaczynają wytrącać się kryształy, zidentyfikowane jako węglany wapnia (RYS. 2B), co może być przyczyną obniżonej wytrzymałości tkanki.

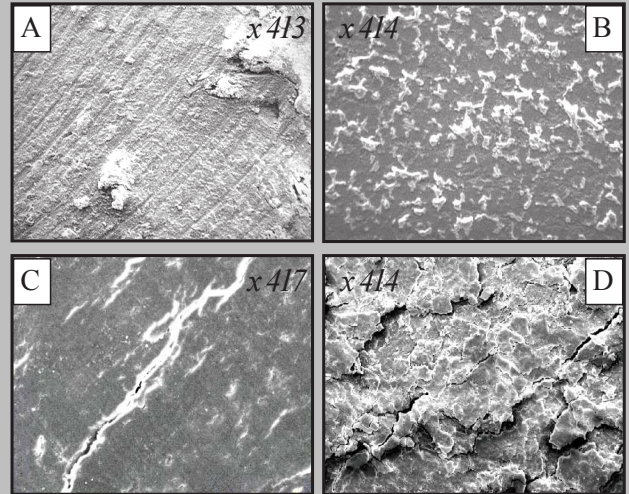
W wyniku kąpeli w związku etyleno-di-aminie wartości parametrów mechanicznych podobnie jak w poprzednich przypadkach uległy obniżeniu. Badania mikroskopowe powierzchni wykazały także pewne odstępstwa w porównaniu z próbką odniesienia. Powierzchnia tkanki kostnej po zastosowaniu tej kąpeli zaczyna pęcznieć, rozwarstwiać się i w efekcie czego odłupywać (rys. 2D). Ostatnia z metod zastosowanie podwyższonej temperatury, a tym samym "podsuszenie" próbki przez wyparowanie z niej wody, nieznacznie zmieniła wartości, co również znajduje potwierdzenie w literaturze [1].

Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań określono wpływ pięciu najpowszechniej stosowanych metod maceracji tkanki kostnej. Na podstawie wyników stwierdzono, iż każda z metod ma wpływ na otrzymywane wartości parametrów mechanicznych. Największe zmiany zaobserwowano dla próbek po gotowaniu, acetonie i etyleno-di-aminie. Zastosowanie tych metod nie tylko obniżyło wartości badanych parametrów, ale również zmieniło charakterystyki materiałowe na bardziej kruche, dlatego też związki te nie powinny być używane w przygotowywaniu próbek do testów wytrzymałościowych. Jak wynika z obserwacji to WODA, a właściwie jej zawartość, ma tutaj decydujący wpływ na charakterystyki biomechaniczne tkanki kostnej. Tak więc, wciąż poszukując optymalnych warunków pomiarów *in vitro* należy w dalszych badaniach uwzględnić jeszcze nie tylko rodzaj, stężenie ale również CZAS zastosowania każdego z używanych preparatów.

Podziękowania

Niniejsza praca stanowi część projektu badawczego KBN No.5 T07A 028 23



RYS. 2. Obrazy tkanki kostnej w mikroskopie skaningowym: A-próbka referencyjna, B-próbka po gotowaniu, C-próbka po kąpeli acetonowej, D-próbka po kąpeli w etyleno-di aminie.

FIG. 2. Microscopic evaluation of samples: A-reference sample, B-boiling sample, C-acetone bath sample, D-etyleno-di-amine bath sample.

Acknowledgements

This work was supported by the Scientific Research Communities of Poland No. 5 T07A 028 23.

Piśmiennictwo

References

- [1] Yuehuei H.A., Draughn R.A., "Mechanical testing of Bone and the Bone - Implant Interface" CRC Press LLC, USA 2000.
- [2] Cowin S.C., et al. "Bone Mechanics Handbook" CRC Press, 2000.
- [3] Będziński R., "Biomechanical Engineering. Selected problems" Wrocław 1997.
- [4] Kuryszko J., Zarzycki J., "Histology of animals" Państw. Wyd. Rolnicze i Leśne 2001.