

BADANIA KOMPOZYTÓW WĘGLOWO- KRZEMOWYCH W WARUNKACH IN VITRO

TERESA GUMUŁA, STANISŁAW BŁAŻEWICZ

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

Streszczenie

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań właściwości biologicznych kompozytów otrzymanych z prekursorów polimerowych, jako możliwych materiałów implantacyjnych. Próbkę kompozytów otrzymano z żywicy polisiloksanowych i włókien węglowych. Próbkę następnie sieciowano i obrabiano cieplnie w temperaturze 1000°C w atmosferze ochronnej argonu. Tak otrzymane próbki przetrzymywano w płynie Ringera i przez okres 6 tygodni badano zmiany pH, a po 28 tygodniach mierzono ilość uwalnianego krzemu do płynu Ringera. Próbkę poddano testom biologicznym polegającym na pomiarze przeżywalności mysich makrofagów linii J 774 w obecności próbek kompozytowych. Kompozyt węgiel-węgiel stanowił próbkę odniesienia. Wyniki pomiarów zmian pH dla kompozytów zawierających w osnowie związek Si-O-C nie przekraczają zakresu norm ustalonych dla biomateriałów, a uzyskane wyniki przeżywalności mysich makrofagów są wyższe dla tych kompozytów, w porównaniu do kompozytu węgiel-węgiel.

Słowa kluczowe: polisiloksany, prekursorzy ceramiczne, kompozyty węglowo-ceramiczne, Si-O-C, badania in vitro

[Inżynieria Biomateriałów, 34, (2004), 34-37]

Wstęp

Jednym z nowszych materiałów stosowanych w ortopedii jest kompozyt węgiel-węgiel (C/C). Implanty wykonane z kompozytu C/C mają konkurencyjne właściwości w porównaniu do innych materiałów implantacyjnych: niski ciężar właściwy, podobieństwo właściwości mechanicznych do właściwości mechanicznych kości. Można także projektować ich mikrostrukturę tak, aby naśladowały mikrostrukturę kości. Biogodność różnych rodzajów materiałów węglowych zależy od metody otrzymywania. Pozostaje niewyjaśnione, czy kompozyty węgiel-węgiel są inertne czy bioaktywne po implantacji [1]. Prowadzono badania nad wytrzymałością granicy kość - implant po 3 miesiącach implantacji do kości królika. Wyniki otrzymane dla układu kość - C/C porównywano z wynikami uzyskanymi dla układów kość - hydroksyapat i kość - stal nierdzewna. Siła zmierzona w teście push-out potrzebna do wypchnięcia implantu C/C była znacznie wyższa od implantu ze stali nierdzewnej ale niższa niż dla hydroksyapatytu [2]. Drugą grupą materiałów implantacyjnych stosowanych w ortopedii jest ceramika bioaktywna, której przedstawicielem jest bioszkle [3, 4]. Tworzy ono naturalne połączenie między kością i implantem, a szybkość odtwarzania tkanki kostnej w obecności bioszkle, w

IN VITRO STUDY OF CARBON-SILICON COMPOSITES

TERESA GUMUŁA, STANISŁAW BŁAŻEWICZ

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

Abstract

Preliminary results on biological properties of polymer - derived composite materials as possible materials for implants are presented. The composite samples were obtained from polysiloxane resin precursors. The samples were cured and heat treated up to 1000°C in an inert atmosphere of argon. The prepared in such a way samples were immersed in Ringer's solution, and pH changes were monitored within the period of 6 weeks, followed by measurement of Si amount released after 28 weeks. The composites were subject to biological tests. As references, the carbon - carbon composites were used. These tests involved viability of J 774 line mouse macrophages in presence of the prepared composites. The results indicate that the pH variations meet the standards concerning biomaterials, and viability of the mouse macrophages is higher in comparison to pure C/C composites.

Keywords: polysiloxanes, ceramic precursors, carbon-ceramic composites, Si-O-C, in vitro studies

[Engineering of Biomaterials, 34, (2004), 34-37]

Introduction

The use of carbon-carbon composites as orthopaedic implants has gained widespread interest over the past decade. These materials are concurrence properties in comparison to the other implant materials. Their major advantages for developing implant materials are low specific weight and similar mechanical properties to bone. Moreover, their microstructure can be designed close to the microstructure of bone. The biocompatibility of various carbon materials depends on their preparation method. However, the unexplained still problem of carbon biomaterials is concerned to their biological behaviour; whether they are inert or bioactive in living body [1]. Investigations on the junction strength of bone - implant system in rabbit, after 3 months implantation were made. The junctions of three systems were analysed, namely bone - C/C, bone - hydroxyapatite and bone - steel [2]. The push-out test showed that the force for C/C composite was significant higher than that for stainless steel, but lower as compared to hydroxyapatite implant. Another group of implant materials for orthopaedy is bioglass - based bioactive ceramics [3, 4]. It creates the natural connection between the bone and implant, and the rate of regeneration of the osseous tissue in presence of bioglass, in comparison to other materials, is the most effective [3, 4, 5]. This can be attributed to the presence of Si-O in the structure of composite matrix.

Bioglasses are fabricated by melting of glass composition

porównaniu do innych materiałów, jest największa [3,4,5]. Związane jest to z obecnością wiązań Si-O.

Bioszklą otrzymuje się stapiając zestaw szklarski w temperaturze ok. 1450°C. Zastosowanie polimerowych prekursorów polisiloksanowych do otrzymania materiałów zawierających wiązania Si-O jest nowym sposobem. Kontrolowana obróbka cieplna takich polimerów pozwala na otrzymanie, w zależności od rodzaju użytego prekursora, warunków obróbki cieplnej - temperatury i szybkości ogrzewania, materiałów o zróżnicowanych właściwościach. Zmienia się ich skład chemiczny - po obróbce cieplnej usieciowanych żywic w temperaturze 1000°C powstają amorficzne materiały o różnych stosunkach ilościowych Si:O [6-9].

W pracy przedstawiono wstępne wyniki badań *in vitro* kompozytów otrzymanych z prekursorów polisiloksanowych jako możliwych, bioaktywnych materiałów implantacyjnych, przeznaczonych do rekonstrukcji tkanki kostnej. W celu zapewnienia specyficznych funkcji proponowanego materiału, kompozyt zbudowany był z dwóch składników - odpowiednie parametry mechaniczne nowego materiału kompozytowego powinny zapewniać włókna węglowe, a bioaktywność powinna wynikać z obecności wiązań Si-O w amorficznej osnowie kompozytu.

Materiały i metody

Do otrzymania kompozytów wykorzystano włókna węglowe T-300 (Torayca) oraz trzy rodzaje żywic polimetylofenylosiloksanowych L 150 X, L 901 i L 4102 produkcji czeskiej (Lucebni zavody, Kolin, Republika Czeska). Żyvice stanowiły substraty do wytworzenia osnów kompozytów. Na podstawie wcześniej wykonanych badań XRD i FTIR stwierdzono, że produktami obróbki termicznej tych żywic w 1000°C są amorficzne materiały Si-O-C, różniące się stosunkiem Si:O:C [6-9]. Kompozyty o jednokierunkowym wzmocnieniu (1D) otrzymywano metodą ciekłej impregnacji. Kompozyty sieciowano i poddawano obróbce cieplnej w atmosferze ochronnej argonu w temperaturze 1000°C przez 210 minut (średnia szybkość grzania 5°C/min). Tak otrzymane kompozyty charakteryzowały się porowatością otwartą rzędu 20-25%. Stosując takie same warunki jak dla kompozytów, obrabiano cieplnie czyste żywice L 901 i L 4102. Te próbki nie posiadały porowatości otwartej. Dodatkowo, otrzymano kompozyt węgiel-węgiel (C/C), którego prekursorem osnowy była żywica fenolowo-formaldehadowa. Kompozyt C/C stanowił próbkę odniesienia.

W celu przeprowadzenia badań *in vitro*, próbki kompozytowe umieszczono w roztworze Ringera (stosunek masy próbki do objętości roztworu 1/100, temperatura przetrzymywania próbek w roztworze 37°C). Badano zmiany pH roztworów, w których przetrzymywano próbki kompozytowe, w ciągu 42 dni. Po upływie 28 tygodni mierzono ilość uwolnionego krzemu do roztworów Ringera z próbek kompozytowych i z próbek czystej żywicy po obróbce cieplnej (metoda ICP). Próbki poddano testom biologicznym - mierzono przeżywalność mysich makrofagów linii J 774 po 7 dniach.

Dyskusja wyników

Na RYS. 1 przedstawiono zmiany pH roztworów Ringera w funkcji czasu.

Wyniki pomiarów zmian pH dla kompozytów zawierających krzem nie przekraczają zakresu norm ustalonych dla biomateriałów (dane pomiarowe według normy powinny zawierać się w zakresie pH 4,0-7,0).

Na kolejnym RYS. 2 zestawiono ilości uwolnionego krze-

at about 1450°C. To obtain similar structures containing Si-O bonds in biomaterial new ways are developed. These methods depend on the use of polysiloxane precursors. Controlled heat-treatment of such polymers allows obtaining materials of diverse properties, depending on the kind of used precursor, conditions of heat-treatment - the temperature and the heating rate. Upon heat treatment their chemical composition changes; after heat-treatment of the cured resins to 1000°C the precursor is transformed into amorphous phase of different quantitative ratios of Si:O [6-9].

In this work preliminary results of *in vitro* study of polysiloxane - derived composite materials as possible, bioactive implant materials, designed to reconstruction of osseous tissue are shown. In order to assure specific biological and mechanical functions of the proposed biomaterial, the composites consisted of two constituents - suitable mechanical parameters of new composite materials should be assured by carbon fibres as reinforcement, whereas bioactivity should result from the presence of Si-O bonds in amorphous composite matrix.

Materials and methods

To prepare the unidirectionally reinforced composites the following components have been used:

- carbon fibres T -300 (Torayca Corp.)
- three types of polysiloxane resins: L 150 X, L 901 and L 4102, producer - Lucebni zavody, Kolin, Czech Republic). The resins were used as precursors of composite matrices.
- phenol-formaldehyde resin for C/C matrix precursor

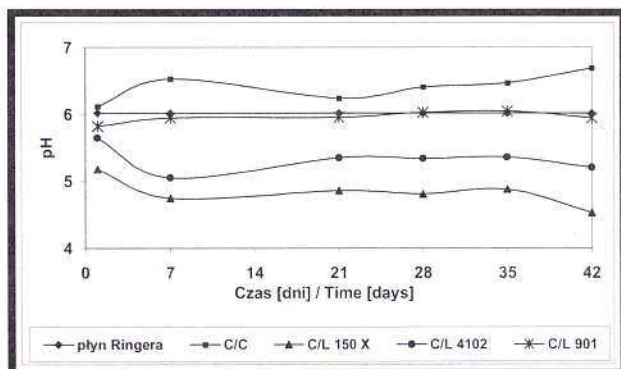
Our previous investigations on the structure of the polymeric residue during thermal treatment by means of XRD and FTIR have demonstrated that amorphous phases containing Si-O-C bonds are formed at 1000°C. Depending on the type of polysiloxane polymer the pyrolysed residues varied in the Si:O:C ratios [6-9]. In this work the composite samples were obtained using unidirectional (1D) prepreg tape technique and liquid impregnation of the resin. The prepreg were air dried to remove the solvent content. The sheets cut from the prepreg tape were unidirectionally stacked in a mold. The stacked layup was cured at 150°C for 210 minutes under pressure. The cured samples were then heat-treated to 1000°C in an argon atmosphere at an average rate of 5°C / min, followed by cooling to room temperature. As a reference material, C/C composites (without silicon) were prepared by similar method of preparation. Phenol - formaldehyde resin was applied to prepare the prepreg tape for C/C composites.

In vitro test was performed using Ringer's solution; the samples were placed in the solution (volume ratio of the sample to the solution was 1/100) and kept at 37°C for 42 days. Variations of pH with the time were registered. The amount of silicon released from the sample to the solution, measured by IPC method was determined after 28 days. This test was also performed for pure cured and heat treated resins (without carbon fibres). Biological test (viability of J 774 line mouse macrophages after 7 days) conformed essentially to the standard tests *in vitro* for biomaterials.

Discussion of results

The changes of the pH of Ringer's solution in function of time are shown in FIG. 1.

The pH variations of the silicon - contained composites do not exceed the range of standards relevant to biomaterials (the measuring values according to standard should contain in the range of pH from 4.0 to 7.0).

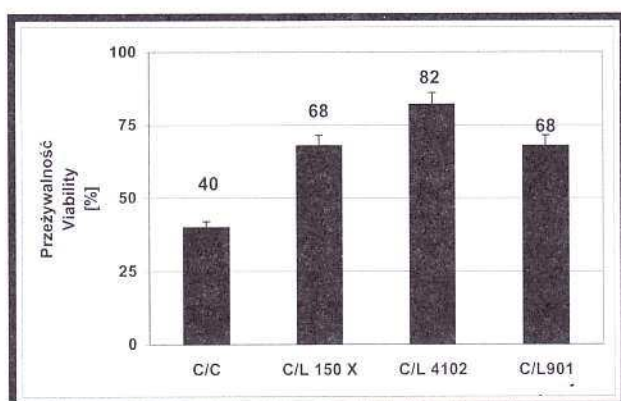


RYS. 1. Zmiany pH roztworów Ringera.
FIG. 1. The pH changes of Ringer's solution.

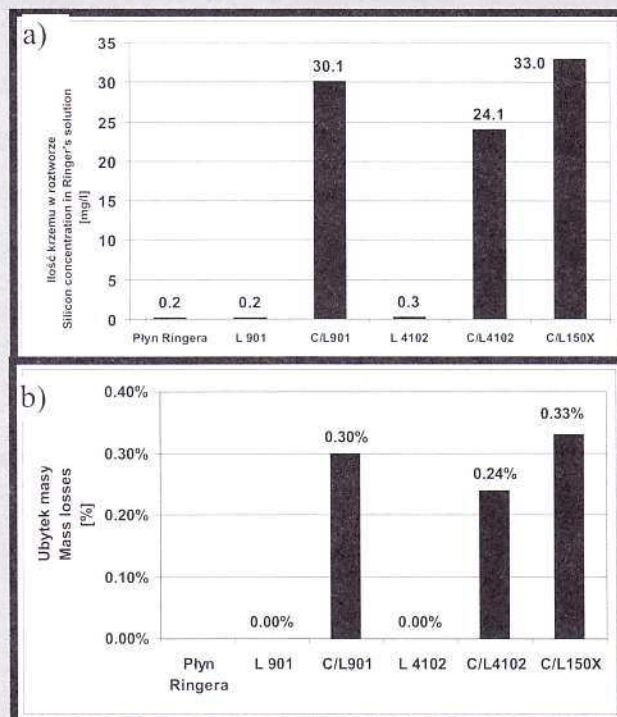
mu do roztworu Ringera z próbek kompozytowych i z próbek czystej żywicy po obróbce cieplnej, po upływie 28 tygodni.

Jak widać z zamieszczonych diagramów, w przypadku próbek czystej żywicy obrabianej cieplnie, krzem praktycznie nie jest uwalniany do roztworu Ringera. Może to świadczyć o trwałości tego materiału w badanym roztworze symulującym środowisko biologiczne. W przypadku próbek kompozytowych krzem jest uwalniany do roztworu w różnych ilościach w zależności od rodzaju prekursora polimerowego. Obecność krzemu w roztworze może świadczyć o możliwej reakcji chemicznej osnowy kompozytu z jonami zawartymi w płynie Ringera. Z drugiej strony, nie można tutaj wykluczyć przechodzenia drobin samej osnowy do roztworu, które następnie identyfikowane są metodą ICP jako jony krzemu. Ponieważ nie obserwuje się reakcji chemicznej krzemu z pozostałości po obróbce termicznej czystego polimeru, bardziej prawdopodobnym mechanizmem przechodzenia krzemu do roztworu jest wymywanie z kompozytu cząstek osnowy. Potwierdzają to dane dotyczące porowatości badanych kompozytów po obróbce termicznej. Jak to wynika z zamieszczonych parametrów mikrostrukturalnych udział porów otwartych w osnowie kompozytowej jest znaczny, w przeciwieństwie do czystej żywicy, która nie zawiera takich porów. Ponadto same próbki kompozytowe charakteryzowały się dużą kruchością, co powodowało wykruszanie się drobin w trakcie preparatyki.

Na RYSUNKU 3 przedstawiono przeżywalność makrofagów mysich w obecności próbek kompozytowych.



RYS. 3. Przeżywalność mysich makrofagów linii J 774 po 7 dniach (dokładność +/- 5%).
FIG. 3. Viability of line J 774 mouse macrophage after 7 days (resolution +/- 5%).



RYS. 2. Ilość uwalnianego krzemu do roztworów Ringera z próbek:

a) w odniesieniu do objętość roztworu, b) w odniesieniu do masy początkowej próbki
FIG. 2. Silicon concentration in Ringer's solution released from the samples:

a) referred to volume of solution, b) referred to initial weight of a sample

The amount of silicon released from the composite samples and from pure cured resin to Ringer's solution, after 28 weeks immersion are gathered in FIGURE 2. As it indicates from the diagram, in the case of pure resin - based samples Ringer's solution is practically free of silicon. This suggests that the materials studied are resistant in simulated biological environment solution. In the case of composite samples silicon is released to the solution in different quantities depending on kind of polymer precursor. The presence of silicon in solution can testify possible chemical reaction of composite matrix with the ions from Ringer's solution. On the other hand, the process of migration of small particles from brittle matrix into solution cannot be excluded. Such particles are identifying as silicon ions by means of ICP method. Based on these results more probable mechanism is detaching debris from porous matrix of composites into solution than typical chemical reaction of silicon - containing structure of heat treated composites with Ringer's solution. Such a mechanism is confirmed by the results of porosity of composite samples after thermal processing. Following the measurements of the microstructural parameters gathered above, the open pore fraction in the composite matrix is significant, contrary to pure resin that does not contain any open porosity. Moreover, only composite samples are characterized by high brittleness, which caused crumbling away the particles in the course of preparative treatment

The viability of the mouse macrophages in presence of the composite samples is shown in the figure 3. The obtained values of viability of the cells in presence of silicon - contained composites are distinctly higher in comparison to carbon - carbon composite. Because C/C composite is known to be highly biocompatible, the higher values of cells

Uzyskane wartości przeżywalności komórek dla kompozytów zawierających krzem są wyraźnie wyższe w porównaniu do kompozytu węgiel-węgiel. Ponieważ kompozyt C/C uznawany jest jako materiał o bardzo dobrej biogodności, wyższe wyniki przeżywalności kompozytów otrzymanych z prekursorów polisiloksanowych mogą świadczyć o potencjalnie dobrej tolerancji biologicznej kompozytów wykonanych z prekursorów polisiloksanowych. Jednakże ich zastosowanie jako biomateriałów na implanty dla chirurgii kostnej wymaga dalszych prac nad uzyskaniem kompozytów bardziej zwartych, a także dalszych badań w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Niezbędne jest zastosowanie innych metod wytwarzania kompozytów dla uzyskania mniejszej porowatości próbek w fazie wstępnego formowania, a także zastosowania techniki impregnacji porowatej matrycy po procesie obróbki cieplnej.

Podsumowanie

W pracy przedstawiono wstępną ocenę materiałów kompozytowych jako potencjalnych biomateriałów dla chirurgii kostnej. Przeprowadzono ocenę tych materiałów w środowisku płynu Ringera i ich wpływ na przeżywalność makrofagów mysich. Badania wykazały, że materiały te nie zmieniają zasadniczo pH płynu Ringera i spełniają wymogi normowe. Badana przeżywalność makrofagów linii J 779 po 7 dniach kształtowała się na poziomie od 68 do 82%, w zależności od rodzaju prekursora matrycy kompozytu. Była ona wyższa niż przeżywalność dla próbek referencyjnych kompozytu C/C, uznawanego jako biogodny. Ujemną cechą badanych kompozytów był stosunkowo wysoki poziom stężenie krzemu wypłukiwanego z osnowy kompozytowej, co wskazuje na konieczność poprawienia metody ich wytwarzania.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu PBZ/KBN/13/TO8/99.

Piśmiennictwo

- [1] Lewandowska-Szumiel M., Komenhlopek J.: Interaction Between Carbon Composites and Bone after Intrabone Implantation, *J. Biomed Mater Res*, 48 (1999) 289-296.
- [2] Lewandowska-Szumiel M., Komender J., Gorecki A., Kowalski M.: Fixation of carbon reinforced carbon composite implanted into the bone, *J Mater Sci Mater Med.*, 8 (1997), 485-488.
- [3] Hench L.L.: Bioactive materials: The potential for tissue regeneration, *J. Biomed Mater Research*, 41 (1998) 511-518.
- [4] Oonishi H., Hench L.L., Wilson J., Sugihara F., Tsuji E., Kushitani S., Iwaki H.: Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes, *J. of Biomat. Res.*, 44 (1999) 31-43.
- [5] Błażewicz S., Stoch L.: Biomateriały, Tom VI edycji Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Warszawa 2003.

viabilities obtained for polysiloxane - based composites can testify about potential for their good biological tolerance. However, their use as the biomaterials for bone surgery implants requires further investigations to improve their compactness and on further *in vitro* and *in vivo* behavior. Development of different methods of preparation of such composites regarding their low porosity during preliminary molding and the use of a method of impregnation of porous matrix after heat treatment process are also required.

Summary

Preliminary evaluation of composite materials as potential biomaterials for bone surgery was shown. These materials were tested in Ringer solution, and their influence on viability of mouse macrophages was assessed. Investigation has shown, that the materials do not alter the pH of Ringer solution and fulfill the requirements for biomaterial standards. The studied viability of mouse macrophages of line J 774 after 7 days contact with the samples reached the level from 68 to 82 %, depending upon the kind of matrix precursor of the composites. This parameter was higher than viability determined for the reference sample of C/C composite being biocompatible. The undesirable effect of the studied composites was high concentration level of silicon rinsed-out from the matrix. This disadvantage should be improved by optimization of polymer infiltration and pyrolysis processing of porous matrix of composite.

Acknowledgements

This work was supported by Polish State Committee for Scientific research (project no. PBZ/KBN/13/TO8/99).

References

- [6] Brus J., Kolar F., Machovic V., Svitilova J.: Structure of silicon oxycarbide glasses derived from poly(methylsiloxane) and poly(methyl(phenyl)siloxane) precursors. *Journal of Non-Crystalline Solids* 289 (2001) 62-74.
- [7] Kolar F., Svitilova J., Machovic V.: Transformation of polymethylphenylsiloxanes to silicon oxycarbide glasses, *Acta Montana ser. B*, 12-126 (2002) 27-34.
- [8] Machovic V., Kolar F., Svitilova J., Matejka P., Mizera J., Maxiner J.: Structural characterization of the free carbon phase of silicon oxycarbides produced by polysiloxane pyrolysis, *Acta Montana ser. B*, 12-126 (2002) 35-46.
- [9] Gumula T., Paluszkiewicz C., Błażewicz M.: Structural characterization of polysiloxane - derived phases produced during heat treatment, *J. Mol. Struct.* (w druku).

UWALNIANIE