

BIOMATERIAŁY ŻELOWE W ORTOPEDII - BADANIA IN VIVO

MARIA ŁĄCZKA*, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA*,
KRYSPIŃ NIEDZIELSKI**

* WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW

** KATEDRA ORTOPEDII,
AKADEMIA MEDYCZNA, ŁÓDŹ

Przedstawiona praca dotyczy oceny biokompatybilności w warunkach *in vivo* materiałów żelowych o różnych składach chemicznych oznaczonych symbolami S2 (80%mol. SiO₂, 16%mol. CaO, 4%mol. P₂O₅) i A2 (40%mol. SiO₂, 54%mol. CaO, 6%mol. P₂O₅). Materiały te otrzymano metodą zol-żel stosując jako substancje wyjściowe następujące związki: tetraetoksykrzemian (TEOS), fosforan (V) trietylu (OP(OC₂H₅)₃), uwodniony azotan wapnia Ca(NO₃)₂ * 4 H₂O. Po wygrzewaniu żeli w odpowiednich temperaturach (800°C dla A2, 700°C dla S2) materiał S2 był amorficzny, natomiast A2 stanowił szkło-krystaliczne tworzywo z hydroksyapatytem jako główną fazą krystaliczną. Otrzymane materiały miały postać granulek o średnicach 0,1-0,8 mm. Z wcześniejszych badań *in vitro* wynika, że materiał A2 w postaci pastylek i spieków charakteryzuje się wysoką bioaktywnością i biozgodnością. W przypadku materiału S2 powyższe cechy wykazują jedynie pastylki natomiast gęste spieki S2 stanowią tworzywo biozgodne [1,2]. Widoczny jest zatem znaczny wpływ formy materiału, temperatury obróbki termicznej i porowatości na właściwości chemiczne tworzyw żelowych. W związku z powyższym, w celu oceny bioaktywności otrzymanych granulek przeprowadzono testy w symulowanym płynie fizjologicznym (SBF) o składzie jonowym zbliżonym do składu ludzkiego osocza. Właściwości bioaktywne materiałów ceramicznych określa się jako zdolność formowania na ich powierzchni warstwy kościopodobnego HAp podczas kontaktu z płynami ustrojowymi. Zmiany zachodzące na powierzchni granulek badano stosując obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM) oraz analizę przy użyciu mikroskopy rentgenowskiej (EDAX). Rejestrowano również zmiany pH i koncentracji wapnia w SBF podczas kontaktu z badanymi materiałami.

Z przeprowadzonych badań wynika, że immersja w SBF tylko w przypadku granulek wykonanych z materiału S2 prowadzi do powierzchniowej krystalizacji fosforanów wapnia (wzrost koncentracji Ca i P na po-

GEL-DERIVED BIOCERAMICS GRANULES IN ORTHOPAEDIC - IN VIVO STUDY

MARIA ŁĄCZKA*, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA*,
KRYSPIŃ NIEDZIELSKI**

* FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS,
UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY, CRACOW

** DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS,
MEDICAL UNIVERSITY, ŁÓDŹ

The purpose of these studies was to confirm *in vivo* biocompatibility of two gel-derived materials with different chemical composition designated as S2 (80%mol. SiO₂, 16%mol. CaO, 4%mol. P₂O₅) and A2 (40%mol. SiO₂, 54%mol. CaO, 6%mol. P₂O₅). These materials are obtained by the sol-gel method, using TEOS, triethylphosphate (OP(OC₂H₅)₃), calcium nitrate Ca(NO₃)₂ * 4 H₂O as the starting compounds. The maximum temperature of thermal treatment is 700-800°C (it is about 500°C lower than in case of conventional methods like melting and controlled crystallisation). After heating to the relative temperatures (800°C for A2, 700°C for S2) the A2 material contains glassy phase and hydroxyapatite and wollastonite as crystalline phases, S2 material was amorphous. Biomaterials were obtained in the form of granules of 0,1 - 0,8 mm dimension. Our previous studies have shown that A2 material in the form of pellet or dense sinter was bioactive and biocompatible, but dense sinter of S2 material was only biocompatible (*in vitro* conditions), however the S2 pellet has shown both bioactivity and biocompatibility [1,2]. These facts indicate that the form of materials, in case of gel-derived materials determines their chemical properties. Hence, the obtained materials were characterised with respect to behaviour in simulated body fluid (SBF) of chemical composition close to human

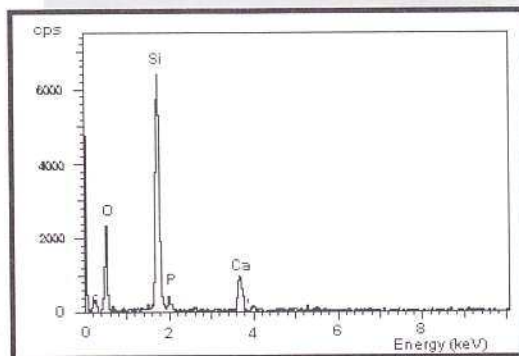
plasma, to estimate their bioactivity *in vitro* conditions, which can be seen as ability to form on its surface a layer of hydroxyapatite as a result of its contact with SBF. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray analysis (EDAX) methods were used for the identification of layers forming, also pH of SBF and Ca concentration in SBF after contact with the tested materials were measured.

From our results it follows that only S2 granules become covered with layer enriched with calcium and phosphorus, which may be evidence of surface crystallisation of calcium phosphate. However the A2 in the form of granules behaves like



RYS.1. Morfologia powierzchni granulek S2 przed kontaktem z płynem fizjologicznym.

FIG.1 SEM image of the surface of S2 granules before contact with SBF.



RYS.2. Analiza EDAX powierzchni granulek S2 przed kontaktem z płynem fizjologicznym

FIG.2 EDAX analysis of the surface of S2 granules before contact with SBF.

wierzchni w porównaniu z materiałem wyjściowym). Granule A2 charakteryzuje znacznie większa rozpuszczalność niż S2 przy jednoczesnym braku formowania na powierzchni warstwy HAp. Można sądzić, że materiał A2 w postaci granulek zachowuje się jak materiał resorbowalny podczas gdy granulki S2 wykazują wysoką bioaktywność

Do badań w warunkach *in vivo* wytypowano materiał S2 mogący stanowić wypełnienie ubytku kostnego a zarazem przyspieszający regenerację tkanki kostnej.

Granulki tworzywa S2 wszczepiano do ubytków w kościach królików. Jako materiał kontrolny zastosowano preparat kostny G sporządzony z naturalnej tkanki kostnej. Po upływie określonych czasów implantacji dokonywano eutanazji królików pobierano kości z wypełnionym ubytkiem i dokonywano oceny stopnia odbudowy ubytku stosując badania radiologiczne, SEM, EDAX, FTIR, XRD. Przeprowadzono również histopatologiczną ocenę wypełnień materiałem S2 i przeszczepem kostnym G.

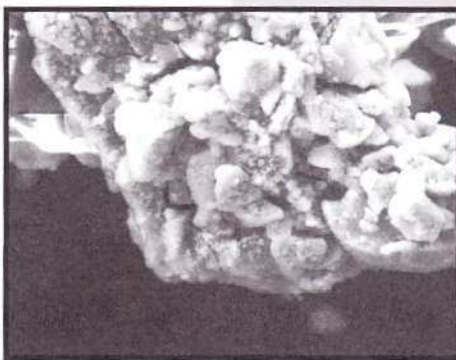
Z oceny radiologicznej wynikało, że już po 3 tygodniach od daty implantacji w większości przypadków następuje odbudowa tkanki kostnej. Pełna przebudowa ubytków zachodziła u większości osobników po 6-ciu tygodniach. Ocena radiologiczna była oceną orientacyjną, nie pozwoliła ona na wykazanie ewentualnych różnic w przebiegu i stopniu odbudowy pomiędzy ubytkami wypełnionymi odpowiednio - biomateriałem S2 i przeszczepem kostnym G.

Obserwacje SEM oraz wyniki analiz EDAX w obszarze wypełnienia ubytku potwierdziły ocenę radiologiczną. Widoczna jest przebudowa ubytku z wyraźną mineralizacją (krystalizacja fosforanów wapnia), zapoczątkowaną na ziarnach materiału S2 i obejmującą praktycznie cały ubytek

Rekonstrukcję tkanki kostnej potwierdzają badania dyfrakcyjne przeprowadzone dla wypełnień ubytków kostnych materiałem S2 i przeszczepem kostnym G.

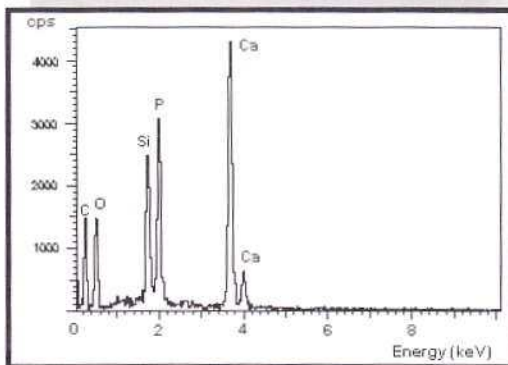
Na dyfraktogramach wszystkich preparatów widoczne są charakterystyczne dla apatyty piki ($d=0,278$ $2\theta=32^\circ$ i $d=0,342$ $2\theta=26^\circ$). Obecność tylko tych dwóch pików i duża szerokość połówkowa może świadczyć o niskiej stopniu skryształizowania preparatu jak również może być związana z obecnością w preparacie dużych ilości substancji organicznych.

Na widmach FTIR wypełnień ubytku po 3, 6 i 12 tygodniach od momentu operacji niezależnie od rodzaju wszczepionego materiału widoczne są pasma charakterystyczne dla drgań wiązań w grupach $[PO_4]$ apatyty: $560-610$ cm^{-1} (O-P-O drgania zginające), 1030 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , 960 cm^{-1} (P-O drgania rozciągające) [4]. Pojawiają się również pasma związane z grupami CO_3 ($870, 1450$ cm^{-1}). Obecność grup węglanowych jest charakterystyczna dla apatyty w żywej tkance kostnej. Pasma przy ok. 1650 cm^{-1} oraz bardzo szerokie pasmo przy $3200-3400$ cm^{-1} świadczy o obecności w strukturze materiału grup OH oraz cząsteczek wody. Pozostałe pasma w zakresach $1520-1550$ cm^{-1} , $2850-2950$ cm^{-1} pochodzą najprawdopodobniej od substancji organicznych budujących kości. Je-



RYS.3. Morfologia powierzchni granulek S2 po 14 dniach kontaktu z płynem fizjologicznym.

FIG.3. SEM image of the surface of S2 granules after contact with SBF.



RYS.4. Analiza EDAX powierzchni granulek S2 po 14 dniach kontaktu z płynem fizjologicznym.

FIG.4. EDAX analysis of the surface of S2 granules after 14 day's contact with SBF.

resorbable materials. These granules have shown much higher solubility in SBF than S2, but there was not observed surface crystallisation of calcium phosphates.

From these facts it follows that the material A2 in the form of granules behaves like resorbable material *in vitro* conditions, while the granules of S2 show high bioactivity.

For the *in vivo* examinations there has been selected material S2, which may function as filling of bone losses at the same time strongly stimulating the regeneration of osseous tissue [3].

In order to estimate biocompatibility of the obtained gel-derived materials, the S2 granules were implanted to the rabbits bone defects, heterograft G was used as a control. After various periods of time implantation the rabbits were killed and the bones were examined using SEM, EDAX, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD) methods. There have been also carried out histopathological tests of the reconstruction of the bone defects filled with S2 material and heterograft G. From the preliminary, radiological evaluation of the fillings it follows that already after 3 weeks of implantation in most cases there take place the reconstruction of the osseous tissue. Complete reconstruction of the losses occurred in most rabbits after 6 weeks. SEM microscopic observations EDAX analysis in the area of the filled defects have confirmed the radiological analysis - clearly visible

mineralisation initiated on S2 grains enveloped practically the entire defect. The reconstruction of the osseous tissue has been confirmed by the performed XRD investigations of the bone defects both with S2 material and heterograft. Peaks with great width characteristics for apatite ($d: 0,278; 0,344$ nm), on the diffraction pattern, may be the indication of low crystallinity and of the presence in the preparation of organic substances in the reconstructed tissue.

On the FTIR spectra of the fillings of the defects after 3 weeks since the operation, independently of the implanted material, there are visible bands characteristic for the vibrations of bonds in the groups $[PO_4]$ of apatite: $560-610$ cm^{-1} (O-P-O bendig), 1030 cm^{-1} , 1090 cm^{-1} , 960 cm^{-1} (P-O stretching) [4]. There appear also bands connected with CO_3 groups (870 cm^{-1} , 1450 cm^{-1}). The presence of carbonate groups is characteristic for apatite in a living bone. Bands at about 1650 cm^{-1} and very broad bands at $3200-3400$ cm^{-1} indicate the presence of OH groups and water particles in the structure of the material. The other bands within the range $1520-1550$ cm^{-1} , $2850-2950$ cm^{-1} derive from organic substances forming the bones. On the spectrum showing the filling of the defect with S2 material after 3 weeks there are visible residual bands at $480, 800$ which may derive from vibrations of O-Si-O bonds in yet not completely reconstructed granules. For comparison there has been presented also the spectrum of the starting granules, on which there are visible bands ascribed to the presence in the material of OH groups and water particles and bands characteristic for Si-O-Si vibrations (1086 cm^{-1} , 800 cm^{-1} , 465 cm^{-1}). Low intensity of these bands and their absence after 12 weeks

dynie na widmie wypełnienia ubytku materiału S2 po 3 tygodniach widoczne są pasma ok. 480 cm^{-1} , ok. 800 cm^{-1} mogące pochodzić od drgań wiązań O-Si-O w niecałkowicie przebudowanych jeszcze granulach.

Dla porównania przedstawiono również widmo FTIR wyjściowych granulek S2, na którym widoczne są pasma charakterystyczne dla drgań wiązań Si-O-Si (1086 cm^{-1} , 800 cm^{-1} , 465 cm^{-1}) pasma związane z drganiami zginającymi wiązania O-P-O, 563 cm^{-1} oraz przypisane obecności w materiale grup OH i cząsteczek H_2O . Niewielka intensywność w/w pasm oraz ich brak po 12 tygodniach pozwala sądzić, że proces przebudowy zachodzi bardzo intensywnie.

Najwięcej informacji odnośnie przebudowy ubytków kostnych dostarczyły badania histopatologiczne (wyniki tych badań stanowią załącznik do Raportu). Ocena histopatologiczna dotyczyła preparatów kostnych z różnych grup czasowych królików z ubytkami wypełnionymi zarówno materiałem S2 jaki i przeszczepem kostnym G. Z badań tych wynikały dwa najważniejsze wnioski:

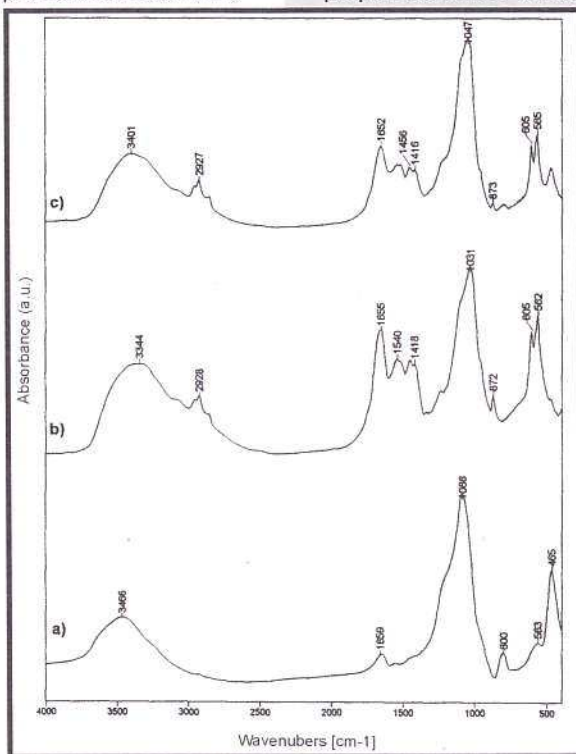
- w powstającej, po wszczepieniu materiałów, tkance włóknistej zachodzi intensywnie metaplasja kostna i kostnienie na podłożu łącznotkankowym;
- procesy wytwarzania kostniny i formowania się kości w przypadku wypełnienia ubytku materiałem S2 znacznie wyprzedzają w czasie podobne zjawiska obserwowane przy zastosowaniu, jako wypełnienia, jedynie przeszczepu kostnego G bez dodatku biomateriału.

of implantation allows to assume that the reconstruction process is very intensive. Spectroscopic analysis of fillings of the defects confirms the earlier results. The intensive process of regeneration of the bone leads to complete rebuilding of the filling.

The most information related to the reconstruction of osseous defects have been provided by histopathological examinations. Histopathological evaluation comprised osseous preparations from various rabbits groups (after various time of implantation) with defects filled both with S2 material and with heterograft

From these investigations two most important conclusions can be drawn:

- in the fibrous tissue forming after implantation of the materials there takes place intensive ossification on connective tissue basis;
- the process of the production of osseous tissue and formation of bones in the case when the defect is filled with S2 granules considerably precede similar phenomena when only a heterograft G without an addition of biomaterial has been applied as filling.



RYS.5. Widma FTIR: a) podstawowych granulek S2; b) ubytku kostnego wypełnionego przeszczepem kostnym G; c) ubytku kostnego wypełnionego materiałem S2 po 3 tygodniach od momentu wszczepienia.

FIG.5. FTIR spectra of: a) basic S2 granules b) bone defect filled by heterograft G c) bone defect filled by S2 after 3 weeks implantation.

Piśmiennictwo

- [1] Łączka, M. Cholewa, K. Łączka-Osyczka, A. J. All. And Comp. 1997, 148, 42-51.
 [2] Łączka, M. Cholewa-Kowalska, K. Łączka-Osyczka, A. Twardydo, M. Turyna, B., J. Biomed. Mat. Res., 2000, 52/4, 601-612

References

- [3] Bruder, S. Fink, D. Caplan, A. J. Cell. Biochem. 1994, 56, 283-294
 [4] Ten Huisen, K.S Martin, R.I et al., J.Biomed. Mat. Res. 1995, 29.