

WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE LITYCH WSZCZEPÓW CEMENTU WAPNIOWOFOSFORANOWEGO Z DODATKIEM ALGINIANU SODU. PORÓWNAWCZE BADANIA EKSPERYMENTALNE

STANISŁAW PIELKA^{1*}, JOANNA KARAS², BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA¹,
DANUTA PALUCH¹, STANISŁAW TRACZYK², WOJCIECH BERENDT¹,
LESZEK SOLSKI¹

¹ AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU,
ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW,
50-326 WROCŁAW, UL. PONIATOWSKIEGO 2

² INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI,
02-676 WARSZAWA, UL. POSTĘPU 9

*E-MAIL: SEKR@CHEKSP.AM.WROC.PL

Streszczenie

Celem badań była ocena biologiczna zmodyfikowanych cementów opartych na fosforanie wapnia, w formie litych walców, przeznaczonych do uzupełniania ubytków kości. Badaniu poddano trzy rodzaje materiałów, oznaczonych roboczo symbolami B, H i K-0,25 alg, o następujących składach komponentów proszkowych: B - α TCP, DCP, DCPD; H - α TCP, HA; K-0,25 alg - α TCP, β TCP, DCPD, alginian sodu. Przeprowadzono badania cytotoksyczności oraz odczynu tkanki kostnej na obecność tych materiałów. Okres obserwacji po wszczepieniu kompozytów w formie litych walców do krętarzy kości udowej królików wynosił 1, 2 i 3 miesiące. W badaniach histologicznych stwierdzono, że w bezpośrednim sąsiedztwie implantów, do 2 miesiąca po wszczepieniu, obecna była faza wysiękowa. Wszczyepy otaczało pasmo tkanki łącznej i kostnej częściowo wnikającej w strukturę implantu. W 3 miesiącu obserwacji ulegające częściowej defragmentacji cementy otaczała spłotowata i blaszkowata tkanka kostna z wyspami tkanki łącznej. Implanty ulegały stopniowej resorpcji od strony brzeżnej. Przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały, że resorpcja cementu i procesy regeneracyjne tkanki kostnej były intensywniejsze w przypadku cementu zawierającego alginian sodu w porównaniu do cementów nie zawierających alginianu.

Słowa kluczowe: biomateriały, cementy, fosforan wapnia, badania eksperymentalne, biogodność
[Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 19-23]

Wprowadzenie

W chirurgii kostnej istnieje zapotrzebowanie na syntetyczne materiały o wysokich parametrach osteokondukcyjnych [1,2]. Ostatnio wiele uwagi poświęca się badaniom nad cementami fosforanowo-wapniowymi, których cechy biologiczne są wyjątkowo korzystne. Jednakże cementy te cechują się stosunkowo niską wytrzymałością mechaniczną, zwłaszcza we wczesnym okresie po zaimplantowaniu [2]. Wiele fosforanowo-wapniowych cementów ulega też dezintegracji po kontakcie z krwią lub innymi płynami ustrojowymi, co ogranicza ich zastosowania w klinicznych procedurach. Doświadczenia laboratoryjne wykazują, że jednym z promotorów zwiększenia kohezji cementów może być alginian sodu, zastosowany jako dodatek do cementu [3].

BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOLID CALCIUM PHOSPHATE CEMENT IMPLANTS WITH ADDITION OF SODIUM ALGinate. EXPERIMENTAL COMPARATIVE STUDIES

STANISŁAW PIELKA^{1*}, JOANNA KARAS², BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA¹,
DANUTA PALUCH¹, STANISŁAW TRACZYK², WOJCIECH BERENDT¹,
LESZEK SOLSKI¹

¹ WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL
SURGERY AND BIOMATERIAL RESEARCH,

2, PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCŁAW, POLAND

² INSTITUTE OF GLASS AND CERAMIC,
9, POSTĘPU STR., 02-676 WARSZAW, POLAND

*E-MAIL: SEKR@CHEKSP.AM.WROC.PL

Abstract

The aim of the study was to evaluate biological properties of modified calcium phosphate cements in the form of solid cylinders used to fill bone loss. Three kinds of materials denominated as B, H and K-0.25 alg composed of powder components: B - α TCP, DCP, DCPD; H - α TCP, HA; K-0.25 alg - α TCP, β TCP, DCPD, sodium alginate, were investigated. Cytotoxicity and bone tissue reaction to the presence of the materials was evaluated. The follow up period after implantation of the composites in the form of solid cylinders to the rabbit trochanter was 1, 2 and 3 months. Histological examinations revealed the presence of exudative phase in the immediate surrounding of the implants up to 2 months after implantation. The implants were surrounded by a layer of connective and bone tissue partly penetrating the structure of the implant. In the 3rd month of observation, partly defragmented cements were surrounded by plexiform and lamellar bone tissue which contained islets of connective tissue. The implants were undergoing gradual resorption on the marginal side. Microscopic examinations revealed that resorption of the material and regenerative processes in the bone tissue were most intense in the case of cement with sodium alginate in comparison to those not containing sodium alginate.

Keywords: biomaterials, cements, calcium phosphate, experimental studies, biocompatibility

[Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 19-23]

Introduction

There is a demand in bone surgery for synthetic materials with high osteoconductive properties [1,2]. Recently much time has been devoted to the studies on calcium phosphate cements, which have exceptionally beneficial biological properties. However the cements are characterized by a relatively low mechanical strength, especially shortly after implantation [2]. Also, many calcium phosphate cements undergo disintegration after contact with blood or other systemic fluids, what limits their applicability in clinical procedures. Laboratory experiments show that the addition of sodium alginate may enhance cohesion of the cement [3]. Alginic acid sodium salt ($C_6H_7NaO_6$) is a natural polysaccharide produced from seaweed from Phaeophyceae family (Macrocystis pyrifera, Laminaria digitata, L. cloustoni, Ascophyllum nodosum).

Sól sodowa kwasu alginowego ($C_6H_7NaO_6$) stanowi naturalny polisacharyd, wytwarzany z wodorostów rodziny Phaeophyceae (*Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *L. cloustoni*, *Ascophyllum nodosum*). Wielkość jego wpływu na wytrzymałość mechaniczną cementów fosforanowo-wapniowych zależy od zastosowanego stężenia. Zbyt wysokie może prowadzić do zahamowania procesu wiązania cementu [4]. Oddziaływanie biologiczne alginianu sodu jest znane i akceptowane. Jest on stosowany między innymi w technologiach żywieniowych, jako dodatek nośników leków, a także jako biomateriał. W Instytucie Szkła i Ceramiki w Warszawie przygotowano trzy rodzaje kompozytowych cementów opartych na fosforanach wapnia (skład podano w następnym rozdziale). Oznaczone B i H wykazywały trwałość w kontakcie z płynami tkankowymi. Natomiast cement K (bez dodatku alginianu) sodu w kontakcie z krwią ulegał powolnemu rozmiękaniu. Integralność struktury cementu K uzyskano po modyfikacji jego składu wyjściowego przez zastosowanie dodatku alginianu do proszku w ilości 0,25% wag. (materiał oznaczony K-0,25 alg). Ponieważ nieznanymi były oddziaływania biologiczne tak przygotowanych kompozytów, celem badań była ocena oddziaływania cytotoksycznego oraz porównawcza ocena odczynów żywej tkanki kostnej na obecność wyżej wymienionych materiałów, w formie litych walców.

Materiał i metody

Badano trzy rodzaje ceramicznych zmodyfikowanych cementów wapniowo-fosforanowych oznaczonych H i B i K-0,25 alg z suplementacją alginianu z udziałem następujących fosforanów: α TCP lub β TCP (α lub β fosforan trójwapniowy $Ca_3(PO_4)_2$), DCP (wodorofosforan (V) wapnia $CaHPO_4$) lub DCPD (wodorofosforan (V) wapnia dihydrat, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) (TABELA 1).

Próbki cementów przeznaczone do badań cytotoksyczności miały formę krążków (10mm x 1,5mm), natomiast przygotowane do wszczepienia do tkanek - formę litych walców (3mm x 10mm). Cementy poddano sterylizacji radiacyjnej.

Badania wykonano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 1 ds. Doświadczeń na Żywych Kręgowcach we Wrocławiu.

Ocena cytotoksyczności

Badania cytotoksyczności przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu próbek cementów z jednowarstwową hodowlą komórek fibroblastów mysich 3T3/Balb. Badania cytotoksyczności wykonano zgodnie z PN-EN ISO 10993 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro*”. Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min., 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 μ g/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO_2 . Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2. Hodowla komórek fibroblastów mysich została założona na płytkach Petriego w ilości 0,5 $\cdot 10^6$ na każdej. Po 24 godzinach na hodowle komórkowe nakładano próbki materiałów i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO_2 . Stopień toksyczności badanych cementów oceniono na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji.

Badania implantacyjne

Badania przeprowadzono na 27 królikach rasy nowozelandzkiej. Po domięśniowym znieczuleniu wykonywano cięcie skóry wzdłuż nasady kości udowej i w odsłoniętych

Its influence on the mechanical strength of calcium phosphate cements depends on its concentration. Too high concentration may lead to the inhibition of cement setting [4]. Biological effects of sodium alginate are known and accepted. It is used, among others, in food technology, as a vehicle for drugs, and also as a biomaterial. Three forms of composite calcium phosphate cements were developed at the Institute of Glass and Ceramics (ISiC) in Warsaw (their composition is given in the next chapter). Those denominated as B and H were stable in contact with systemic fluids. On the other hand, cement K (without the addition of sodium alginate) displayed slow softening in contact with blood. The integrity of cement K structure was obtained after modification of its initial composition with the addition of alginate to the powder in the amount of 0.25% of weight (material denominated K-0.25 alg). Since the biological effects of thus prepared composites were unknown, the aim of the study was to evaluate the cytotoxic effect and to assess comparatively the reaction of live bone tissue to the presence of the above described materials in the form of solid cylinders.

Material and methods

The investigations involved three kinds of modified

Symbol cementu / Symbol of the cement	Proszek, % wag. / Powder, wt%	Płyn / Fluid
B	α TCP 90.1 DCP 6.6 DCPD 3.3	roztwór bursztynianu sodu 12% wag. / 12 wt% sodium succinate solution
H	α TCP 98.0 HA 2.0	roztwór Na_2HPO_4 3% wag. / 3 wt% Na_2HPO_4 solution
K-0,25 alg	α TCP 77.80 β TCP 16.96 DCPD 4.99 alginian sodu 0.25	roztwór bursztynianu sodu 12% wag. / 12 wt% sodium succinate solution

TABELA 1. Skład badanych cementów wapniowo-fosforanowych.

TABLE 1. Composition of the investigated calcium-phosphate cements.

ceramic calcium phosphate cements designated H, B and K-0.25 alg with alginate supplementation with the following composition of powder components: α TCP or β TCP (α or β tricalcium phosphate - $Ca_3(PO_4)_2$), DCP (calcium hydrogen phosphate - $CaHPO_4$) or DCPD (calcium hydrogen phosphate dihydrate - $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) (TAB.1).

Samples of cement for cytotoxicity examination were prepared in the shape of circles (10mm x 1,5mm), while those prepared for implantation were solid cylinders (3mm x 10mm). The cements were submitted to radiation sterilization.

The study protocol was approved by the Local Ethics Committee No 1, for Experiments on Live Vertebrates in Wrocław.

Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity evaluation involved immediate contact of the samples with single-layer culture of mice fibroblast 3T3/Balb. Cytotoxicity examinations were performed according to PN-EN ISO 10993 „Biological evaluation of medical products. Part 5: In vitro cytotoxicity”. Cells were cultured in Eagle's medium with 10% addition of inactivated (30 min., 56°C) calf serum and 100 u/ml of penicillin, 100 μ g/ml of streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine at 37°C, in atmosphere containing 5% CO_2 . The cells were transplanted using solution of 0.05% trypsin with 0.02% EDTA in PBS, pH 7.2. Mice fibroblasts culture was performed on Petri dishes in the amount of 0.5 $\cdot 10^6$ for each dish. After 24 hours, cell cultures were covered by samples of material and incubated at 37°C in air containing 5% CO_2 . The degree of toxicity of the investigated cements was assessed on the basis of pathological changes in the cells, their survival and capability to proliferate.

Implantation examinations

The examinations were performed on 27 New Zealand rabbits. Following intramuscular anaesthesia, the skin was incised along the femoral bone epiphysis. In each of the

krętarzach mniejszym i większym nawiercano po 2 kanały (o średnicy 3mm), w których umieszczano cylindryczne próbki cementu. Mięśnie i skórę zszywano warstwowo. W zaplanowanych terminach sekcyjnych, tj. po 1, 2, i 3 miesiącach, wykonano eutanazję. W czasie sekcji, w pierwszej kolejności oceniano makroskopowo bliźnę pooperacyjną, wygląd tkanek w miejscu wszczepienia oraz stan wybranych narządów wewnętrznych. Kości udowe wraz z implantami pobierano do badań histologicznych. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą Van Gieson (VG).

exposed lesser and greater trochanters two canals (3 mm in diameter) were drilled into which the cylindrical samples of cement were inserted. The muscles and the skin were sutured in layers. In the planned time, i.e. after 1, 2 and 3 months the rabbits were sacrificed. On autopsy the post-operative scar and the tissues at the site of injection were evaluated macroscopically. Next femoral bone samples with implants were collected for histopathological examination. The preparations were stained with haematoxylin and eosin (HE) as well as with Van Gieson's method (VG).

Wyniki

Ocena cytotoksyczności

Po 24, 48 i 72 h w hodowlach po kontakcie z cementami K-0,25 alg, B, H i kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. We wszystkich hodowlach stwierdzono komórki w podziałach. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielania od podłoża ani lizy błon komórkowych. Proliferacja komórek w hodowlach kontrolnych i z cementami była prawidłowa. Gęstość komórek w hodowlach po kontakcie z cementami była wyższa, w porównaniu do gęstości komórek w hodowlach kontrolnych. Odsetek komórek martwych po 72h w hodowlach z badanymi cementami był niższy od odsetka komórek martwych w hodowlach kontrolnych. W obserwacji hodowli pod mikroskopem stwierdzono degradację ceramicznych cementów kostnych K-0,25 alg, B i H, która zwiększała się z upływem czasu i była największa po 72 h. Po 24, 48 i 72 h w płynach hodowlanych obserwowano w pobliżu próbek liczne, oddzielone drobiny materiałów.

Badania implantacyjne

W czasie obserwacji pooperacyjnych zwierzęta zachowały czynną i bierną ruchomość w stawach biodrowych i stały przyrost masy ciała. Rany skórne były wygojone przez rychłozrost i pokryte nową okrywą włosową. Sekcje zwierząt wykonano 1, 2 i 3 miesiące po implantacji badanych cementów.

Badania makroskopowe

Obraz makroskopowy po implantacji wszystkich badanych cementów był podobny. Po odpreparowaniu tkanek miękkich uwidoczniło krętarze mniejszy i większy kości udowej o prawidłowej wielkości i barwie. W 1 miesiącu po operacji miejsca implantacji były wyraźnie dostrzegalne, pokryte częściowo okostną. W późniejszych terminach wszczepy były słabiej widoczne, były całkowicie pokryte okostną i pozostawały mocno zespolone z otaczającą je kością. W przekrojach poprzecznych kości udowych stwierdzono do 3 miesiąca zachowanie cylindrycznej formy wszczepów, które ulegały jedynie pojedynczym porzecznym pęknięciom.

W narządach wewnętrznych nie znaleziono zmian o charakterze patologicznym.

Badania histologiczne

cement B

Po 1 miesiącu obserwacji, w gąbczastej tkance kostnej widoczne były wszczepy ograniczone pasmem nowo wytworzonej tkanki kostnej lub tkanki łącznej włóknistej od strony kości, oraz tkanki łącznej luźnej od strony wszczepu.

Results

Cytotoxicity evaluation

After 24, 48 and 72 h in cultures in contact with the following cements: K-0.25 alg, B, H and controls the cells adhered to the base and displayed normal morphological features. Cells division was found in all the cultures. The cells did not display any features of agglutination, vacuolization, separation from the base and cellular wall lysis. Cells proliferation in control cultures and in cultures with cements was normal. The cells cultures in contact with cement revealed higher cell density in comparison to the density in control cultures. The percentage of dead cells after 72 h in cultures with the investigated cements was lower than in the control cultures. Microscopic evaluation revealed degradation of ceramic bone cements K-0.25 alg, B and H, which increased with time and was the highest after 72 h. After 24, 48 and 72 h, numerous separate particles of the materials were observed in the culture fluids in the close vicinity to the samples.

Implantation examinations

In the observation period the animals preserved active and passive mobility in the hip joints and exhibited constant growth of body mass. The skin wounds were healing by first intention and covered with hair. The animals were autopsied 1, 2 and 3 months after implantation of the investigated cements.

Macroscopic examinations

The macroscopic picture after implantation of all the investigated cements was similar. Following soft tissues preparation, the lesser and greater trochanters of the femoral bone were exposed and they were found to be of normal size and colour. One month after the surgery, the implantation sites were partly covered with periosteum. Two and three months after the operation the implants were less visible; they were completely covered with periosteum and fused firmly with the surrounding bone. Transverse sections of the femoral bones revealed maintained cylindrical shape of the implants until the third month, with merely the presence of transverse cracking.

Internal organs did not reveal any pathological changes.

Histological examinations

cement B

After 1 month of observation, in the spongy bone could be visible the presence of implants separated with a layer of newly formed bone tissue or fibrous tissue from the side of the bone and loose connective tissue from the side of the implant.

Parametr / Parameter	Czas badania / Duration of examination [h]	Symbol badanego materiału / Symbol of the investigated cement					
		Cement K-0,25 alg	Kontrola / Control	Cement B	Kontrola / Control	Cement H	Kontrola / Control
Zmiany morfologiczne / Morphological changes	24	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	48	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
	72	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Gęstość komórek / Cells density [ml x 10 ³]	24	0,76± 0,08	0,82± 0,02	0,82± 0,026	0,76± 0,03	0,84± 0,026 #	0,76± 0,03
	48	1,46± 0,09	1,36± 0,02	1,46± 0,314	1,28± 0,23	1,38± 0,243	1,28± 0,230
	72	2,42± 0,07	2,2± 0,15	2,46± 0,307	2,1± 0,353	2,50± 0,360	2,1± 0,353
Komórki martwe / Dead cells [%]	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	1	1	1	3	1	3
Stopień toksyczności / Toxicity	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0

TABELA 2. Wyniki badań cytotoksyczności w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24, 48 i 72 h w kontakcie z cementami K-0,25 alg, B i H (n.s. - nie stwierdzono; # - istotna różnica dla p,0,05).
TABLE 2. Results of cytotoxicity examinations in mice fibroblasts cultures 3T3Balb/C after 24, 48 and 72 h in contact with K-0.25 alg, B and H cements (n.s. - not found, # - significant difference for p,0.05).

W bezpośrednim sąsiedztwie znajdowano homogenicznie barwiącą się pozostałość fazy wysiękowej, nagromadzenia komórek zapalnych, cienkościenne naczynia krwionośne. W otaczającej wszczepu tkance kostnej obecne były liczne osteoblasty oraz fragmenty materiału. W 2 miesiącu cementy otaczało pasmo tkanki kostnej, a miejscami włóknistej tkanki łącznej. W paśmie tym znajdowano pozostałości wysięku w postaci homogenicznie barwiących się mas, nagromadzenie komórek zapalnych oraz silnie zaznaczoną aktywność osteoblastów. Pojedyncze wąskie pasma tkanki kostnej i łącznej miejscami wnikały na całą szerokość w strukturę wszczepu. Od strony szpiku kostnego wszczep oddzielało pasmo tkanki łącznej z ogniskami kostnienia. 3 miesiące po implantacji w preparatach histologicznych widoczne były pofragmentowane tworzywa otoczone przerośniętą tkanką kostną. Miejscami obserwowano rozplem włóknistej tkanki łącznej.

cement H

W 1 miesiącu po wszczepieniu, w obrazie mikroskopowym widoczne były materiały otoczone szerokim pasmem tkanki łącznej bogatą komórkową od strony implantu i włóknistej od strony gąbczastej tkanki kostnej. Opisywane pasmo miejscami wnikało w obręb wszczepu, w formie wypustek. Znajdowano w nim fragmenty cementu z ogniskami kostnienia z udziałem aktywnych osteoblastów na powierzchni beleczek kostnych. W otaczającym implanty szpiku kostnym widoczne były pozostałościami wysięku, liczne cienkościenne naczynia krwionośne, homogenicznie barwiąca się masa. W 2 miesiącu obserwacji widoczne były wyraźnie pofragmentowane wszczepy, które były ograniczone i poprzerastane pasmami tkanki łącznej i kostnej. W szpiku kostnym znajdowano małe fragmenty cementu, ogniskowo nagromadzone komórki żerne, w tym osteoklasty oraz ogniska kostnienia. W 3 miesiącu po operacji w obrazie mikroskopowym widoczne były pofragmentowane wszczepy ograniczone blaszkowatą tkanką kostną, a miejscami tkanką łączną.

cement K-0,25 alg

W gąbczastej tkance kostnej, w 1 miesiącu po operacji, widoczne były pofragmentowane wszczepy przerośnięte i otoczone tkanką kostną i łączną. W szpiku kostnym obecne były pozostałości fazy wysiękowej, liczne cienkościenne naczynia krwionośne. W 2 miesiącu obserwacji widoczne były implanty otoczone pasmem nowo wytworzonej tkanki kostnej o cechach tkanki kostnej blaszkowatej oraz tkanki łącznej wnikającej w formie wypustek w przestrzeń wszczepu. 3 miesiące po implantacji, w preparatach barwionych HE widoczne były pomniejszone wszczepy tkwiące tkance kostnej blaszkowatej, ograniczone w pojedynczych wypadkach wąskimi i nielicznymi wysepkami tkanki łącznej. Z dala od centralnego wszczepu w tkance kostnej znajdowano fragmenty tworzywa otoczone tkanką kostną. Cement był wyspowo obecny w szpiku kostnym, otoczony tkanką chrzęstną lub blaszkowatą tkanką kostną.

In immediate surrounding there were homogeneously staining remains of the exudative phase, aggregation of inflammatory cells and thin-walled blood vessels. The bone tissue surrounding the implant contained numerous osteoblasts and fragments of the material. In the second month, the cements were surrounded with a layer of bone tissue and fibrous tissue in places. This layer contained remains of exudates in the form of homogeneously staining mass, aggregation of inflammatory cells and strongly marked osteoblasts activity. In some places single narrow bands of bone and connective tissues penetrated the structure of the implant on the whole width. From the side of bone marrow the implant was separated with a layer of connective tissue with the foci of ossification. Three months after implantation, the histological preparations contained fragmented cements surrounded with overgrown bone tissue. Proliferation of fibrous tissue was observed in places.

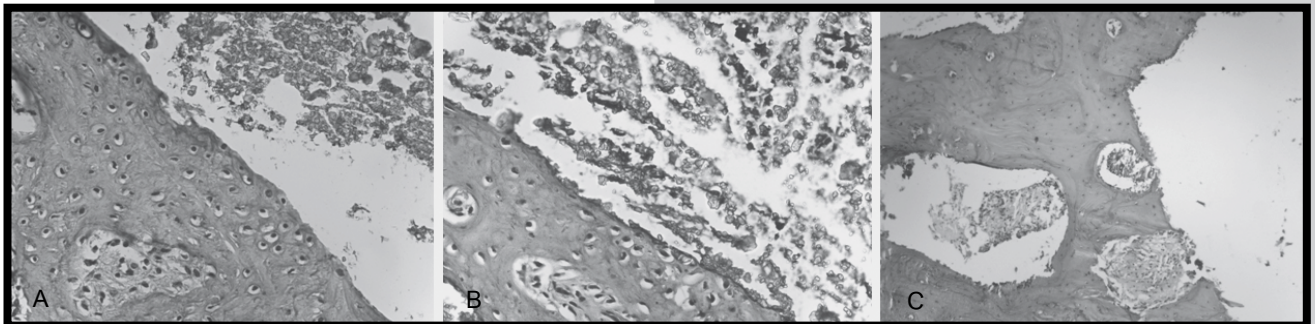
cement H

One month after the implantation the microscopic picture revealed that the cements were surrounded with a broad band of rich in cells connective tissue from the side of the implant and fibrous tissue from the side of spongy bone. In places the band penetrated the implant in the form of projections. It contained fragments of cement with foci of ossification with the participation of active osteoblasts on the surface of bone trabeculae. The bone marrow surrounding the implant contained the remains of exudates, numerous thin-walled blood vessels, homogeneously staining mass. Observation in the second month revealed distinct, fragmented implants which were limited and overgrown with bands of connective and bone tissue. Bone marrow contained small fragments of cement, focally accumulated phagocytes, including osteoclasts, and foci of ossification. The microscopic picture in the third month after implantation displayed fragmented implants limited with lamellar bone tissue and connective tissue in places.

cement K-0.25 alg

One month after the operation the spongy bone revealed the presence of fragmented implants which were overgrown and surrounded with bone and connective tissues. The bone marrow contained the remains of exudative phase and numerous thin-walled blood vessels.

The observation two months after the operation showed that the implants were surrounded with layers of newly-formed bone tissue of the type of lamellar bone tissue and connective tissue penetrating the implant in the form of projections. Three months after the implantation, preparations stained with HE revealed decreased implants in lamellar bone tissue, which in single cases were limited with narrow and scarce islets of connective tissue. In remote locations from the central implant there were fragments of cement surrounded with bone tissue. Islets of the cement were found in the bone marrow, they were surrounded with cartilaginous tissue or lamellar bone tissue.



RYS.1. Obraz mikroskopowy 3 miesiące po implantacji litych cementów fosforanowo-wapniowych z dodatkiem algienu sodu do tkanki kostnej.

FIG.1. Microscopic view of solid calcium phosphate implants implanted to bone tissue in 3 months observation.

(A) cement K-0.25 alg (H&E, 560x), (B) cement B (H&E, 560x), (C) cement H (H&E, 560x).

Podsumowanie

Badania biologiczne obejmowały ocenę cytotoksyczności oraz miejscowej reakcji tkanki kostnej 1, 2 i 3 miesiące po wszczepieniu do kości udowych królików litych fosforanowo-wapniowych cementów: K-alg z dodatkiem alginianu oraz dwóch cementów B i H bez suplementacji.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono brak działania cytotoksycznego. W ocenie makroskopowej, w badaniach implantacyjnych, stwierdzono podobny obraz wgajania się wszystkich trzech badanych cementów. W okresie od 1 do 3 miesiąca po wszczepieniu próbki wszczepów tkwiły w nasadach kości udowych, zachowały pierwotny kształt cylindryczny i były pokryte okostną. W badaniach mikroskopowych tkanki kostnej wokół wszystkich wszczepów stwierdzono obecność fazy wysiękowej w bezpośrednim sąsiedztwie implantów w 1 miesiącu i częściowo w 2 miesiącu po wszczepieniu. Cementy otaczało pasmo tkanki łącznej częściowo wnikażącej w strukturę implantu. Obserwowano wysoką aktywność osteoblastów układających się wzdłuż beleczek splotowatej i blaszkowatej tkanki kostnej, która obok skąpej tkanki łącznej otaczała w 3 miesiącu obserwacji ulegające częściowej defragmentacji cementy. Implanty ulegały stopniowej resorpcji, głównie od strony brzeżnej, zachowując pierwotny cylindryczny kształt. Przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały, że procesy regeneracyjne były najefektywniejsze po wszczepieniu cementu oznaczonego symbolem K-0,25 alg, z suplementacją alginianu sodu, a nieco wolniejsze wokół tworzyw B i H. Na podobne obserwacje wskazują Ueyama Y i inni w swoich badaniach nad zastosowaniem membrany alginianowej do regeneracji ubytków kostnych u królików. Wykazali oni pozytywny wpływ cementów fosforanowo-wapniowych z dodatkiem alginianu na procesy regeneracji tkanki kostnej. Zawartość alginianu nie skraca czasu gojenia, ale w jego obecności obserwuje się szybszy proces tworzenia się prawidłowej blaszkowatej tkanki kostnej, podczas gdy w grupie kontrolnej (cementy B i H) obserwowano większy udział tkanki łącznej [5]. Zarówno badania własne jak i dane uzyskane przez innych autorów wskazują, że lite cementy fosforanowo-wapniowe spełniają wymogi zastosowania klinicznego w chirurgii kostnej. Kompozyty cementowe wzbogacane alginianem sodu wykazują większą trwałość w kontaktach z płynami ustrojowymi [4].

Wnioski

1. Wytworzone cementy oparte na fosforanach wapnia nie wywoływały efektu cytotoksycznego.
2. Wszystkie badane cementy oznaczone symbolami B, H i K-alg, ulegały w żywych tkankach częściowej biodegradacji i fragmentacji. Proces ten był najbardziej nasilony w 3 miesiącu po wszczepieniu do kości.
3. W 2 miesiącu po wszczepieniu do kości, wokół i wewnątrz pofragmentowanych wszczepów tworzyła się blaszkowata tkanka kostna.
4. Wszystkie trzy badane materiały charakteryzowała wysoka biogodność. Proces osteokondukcji najszybciej przebiegał po implantacji K-alg, zawierającego dodatek alginianu sodu.

Piśmiennictwo

- [1] dos Santos LA, De Oliveria LC, Rigo EC, Carrodegus RG, Boschi AO, De Arruda AC: Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. *Bone*. 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.
- [2] Pielka S, Woźny W, Żywicka B, Paluch D, Solski L, Karaś J.: The biocompatibility of the composite of porous ceramic corundum with polyvinyl alcohol dripped with vancomycin. *Inter. Conf. "Biomaterials in regenerative medicine"*. Vienna, October 22-25, 2006.; s.69, P-36.

Resume

The biological examinations included evaluation of cytotoxicity and local reaction of the bone tissue 1, 2 and 3 months after implantation of solid calcium phosphate cements: K-alg with addition of alginate and two cements without supplementation, B and H, into the rabbit femoral bones.

The examinations did not demonstrate any cytotoxic effect. Macroscopic evaluation in implantation studies revealed a similar healing pattern in all the investigated cements. In the time from one to three months after implantation, implant samples were present in the femoral bone epiphyses, they maintained their initial cylindrical shape, and were covered with periosteum. Microscopic evaluation of the bone tissue around the implants revealed the presence of exudative phase one month, and partly two months after the implantation. The cements were surrounded with layers of connective tissue partly penetrating the structure of the implant. The observations showed high activity of osteoblasts, which were arranged along the lamella of plexiform and lamellar bone tissue, which, together with scarce connective tissue was surrounding partly defragmented cements in the 3rd month of observation. The implants underwent partial resorption, mainly from the marginal side, but their initial cylindrical shape was maintained. Microscopic examination showed that the regenerative processes were most effective after implantation of cement designated as K-0.25 alg, with sodium alginate supplementation, being slightly slower around cements B and H. Similar observations were reported by Ueyama Y and others in their studies on the use of alginate membrane in bone loss regeneration in the rabbit. They demonstrated a positive effect of calcium phosphate cements with the addition of alginate on the processes of bone tissue regeneration. The addition of alginate does not shorten the healing time, but it prompts formation of lamellar bone tissue, while in the control group (cements B and H), a higher participation of connective tissue was observed [5]. Both, own studies, as well as data obtained by other authors demonstrate that solid calcium phosphate cements fulfill the requirements for clinical use in bone surgery. Cement composites enriched with sodium alginate are also more durable in contact with systemic fluids [4].

Conclusions

1. Calcium phosphate cements did not produce any cytotoxic effect.
2. All the investigated cements, denominated as B, H and K-alg, underwent partial biodegradation and fragmentation in the live tissue. The process was most pronounced 3 months after their implantation to the bone.
3. Lamellar bone tissue was formed around and inside fragmented implants two months after cement implantation.
4. All three investigated cements were characterized by high biocompatibility. The process of osteoconductivity was the quickest in the case of cement K-alg containing sodium alginate.

References

- [3] Khairoun I, Driessens FC, Boltong MG, Planell JA, Wenz R: Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 1999 Feb;20(4):393-8.
- [4] Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M, Nagayama M, Asaoka K. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials*. 1995 May;16(7):527-32.
- [5] Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, Ryoike K. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):2027-33.