

# OCENA WŁASNOŚCI FIZYCZNYCH I BIOLOGICZNYCH SAMOORGANIZUJĄCEGO SIĘ BIOMATERIAŁU OTRZYMANEGO Z CHITOZANU/FOSFORANU WAPNIA/ALGINIANU DO ZASTOSOWAŃ STOMATOLOGICZNYCH

MARTYNA KUCHARSKA<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ BUBAK<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOWALCZYK<sup>1</sup>, WITOLD BOJAR<sup>2</sup>, TOMASZ BRYNK<sup>3</sup>,  
ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, TOMASZ CIACH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LABORATORIUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,  
WYDZIAŁ INŻYNIERII CHEMICZNEJ I PROCESOWEJ,  
POLITECHNIKA WARSZAWSKA

<sup>2</sup> ZAKŁAD WYROBÓW MEDYCZNYCH, NARODOWY INSTYTUT LEKÓW

<sup>3</sup> WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA

<sup>4</sup> ZAKŁAD PATOMORFOLOGII, WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

\* E-MAIL: M.KUCHARSKA@ICHIP.PW.EDU.PL

## Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zaprojektowanie i otrzymanie wstrzykiwalnego biomateriału o własnościach osteokondukcyjnych, który potencjalnie mógłby znaleźć zastosowanie w procesach augmentacji kości przed leczeniem implantologicznym z wykorzystaniem sterowanej regeneracji kości (GBR). W tym celu opracowano samoorganizujący się biomateriał otrzymany z granulatu chitozan/fosforan trójwapnia oraz soli sodowej kwasu alginowego (CH/TCP/Alg).

Opracowany materiał przebadano pod względem morfologii i mikrostruktury, zarówno granulatu, jak i uformowanych aglomeratów. Własności fizyczne, takie jak czas żelowania oraz wytrzymałość mechaniczna na ściskanie były przedmiotem niniejszych badań. Przeprowadzono także testy *in vivo* opracowanego biomateriału na modelu szczura. Dokonano oceny odpowiedzi modelu zwierzęcego na zaimplantowany biomateriał, a wyniki porównano z alloplastycznym materiałem komercyjnie dostępnym. Otrzymane wyniki wskazały, że opracowany wstrzykiwalny system spełnia wymagania pod kątem zastosowań w sterowanej regeneracji kości.

**Słowa kluczowe:** chitozan, alginian,  $\beta$ -fosforan trójwapnia, wstrzykiwalny system, sterowana regeneracja kości, badania *in vivo*, biomateriał

[Inżynieria Biomateriałów, 105, (2011), 20-24]

## Wprowadzenie

Sterowana regeneracja kości (GBR) jest techniką stomatologiczną, w której wykorzystuje się rozmaite materiały o potencjale kościotwórczym do regeneracji i augmentacji kości (np. rekonstrukcja wyrostka zębodołowego, sinus-lift – podnoszenie dna zatoki szczękowej). Terapia z wykorzystaniem GBR wymaga także zastosowania dodatkowej membrany, która uniemożliwia wzrost tkanek miękkich do regenerowanego miejsca. Celem badań było opracowanie formułacji wstrzykiwalnego biodegradowalnego materiału o potencjale kościotwórczym, który mógłby stanowić wsparcie dla wzrostu nowej tkanki kostnej.

# PHYSICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION OF CHITOSAN/CALCIUM PHOSPHATE/ALGINATE SELF-SETTING BIOMATERIAL FOR DENTAL APPLICATIONS

MARTYNA KUCHARSKA<sup>1\*</sup>, GRZEGORZ BUBAK<sup>1</sup>,  
MAGDALENA KOWALCZYK<sup>1</sup>, WITOLD BOJAR<sup>2</sup>, TOMASZ BRYNK<sup>3</sup>,  
ŁUKASZ KOPERSKI<sup>4</sup>, TOMASZ CIACH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY,  
FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

<sup>2</sup> MEDICAL DEVICES DEPARTMENT,  
NATIONAL MEDICINES INSTITUTE, POLAND

<sup>3</sup> FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,  
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND

<sup>4</sup> DEPARTMENT OF PATHOLOGY,  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, POLAND

\* E-MAIL: M.KUCHARSKA@ICHIP.PW.EDU.PL

## Abstract

The main objective of the work was to design and fabricate an injectable biomaterial with osteoconductive properties for bone augmentation and potential to be used in dental applications in peri-implant therapy concerning guided bone regeneration. For this purpose, a self-setting biomaterial consisting of chitosan/tricalcium phosphate microparticles and sodium alginate was formulated (CH/TCP/Alg).

The obtained material was characterized as far as microsphere and formed agglomerates morphology and microstructure. Physical properties relating to setting time and mechanical properties were also investigated. Finally, *in vivo* response to implanted biomaterial was studied on rat model and compared with commercially available alloplastic material. The obtained results showed that designed injectable biomaterial fulfilled main requirements for guided bone regeneration application.

**Keywords:** chitosan, alginate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, injectable systems, guided bone regeneration, *in vivo* studies, biomaterial

[Engineering of Biomaterials, 105, (2011), 20-24]

## Introduction

Guided bone regeneration (GBR) is a dental technique utilizing various materials for missing bone regeneration (for example ridge reconstruction, sinus-lift procedure). The therapy requires also using an additional membrane acting as a barrier preventing soft tissue ingrowth into regenerated area. The goal of presented work was to develop formulation of injectable, biodegradable material acting as a bone substitute that could support new bone tissue ingrowth. The fabricated biomaterial was based on chitosan, which has been widely discussed so far as far as its application in bone tissue engineering [1-3]. Evaluation of physical and biological properties relating to designed self-setting biomaterial is discussed herein.

Podstawowym materiałem do wytwarzania rusztowań był chitozan, którego zastosowanie w inżynierii tkanki kostnej było do tej pory szeroko omawiane [1-3]. W niniejszej pracy przedstawiono ocenę własności fizycznych oraz biologicznych otrzymanego samoorganizującego się biomateriału.

Biomateriał tworzący w oparciu o układ dwufazowy, w skład którego wchodzi: faza stała – granulaty chitozan (CH)/β-fosforan trójwapnia (TCP) oraz faza płynna – 2% roztwór soli kwasu alginowego [4,5]. Formowanie układu wstrzykiwalnego polegało na uwalnianiu jonów wapnia z granulek CH/TCP do płynnej fazy alginianowej, która podlega żelowaniu w obecności uwolnionych jonów.

## Materiały i Metody

Do otrzymywania rusztowań wykorzystano chitozan o 95% stopniu deacetylacji [1,6], który pozyskano z Medical Heppe GmbH (Niemcy). β-fosforan trójwapnia oraz sól sodową kwasu alginowego zakupiono w Sigma Aldrich.

Granulki CH/TCP otrzymano na drodze hydrodynamicznego formowania kropli zawiesiny, które były wkraplane do kąpieli precypitującej stanowiącej wodny roztwór NaOH. Zawiesinę CH/TCP uzyskano poprzez dyspersję sproszkowanego TCP w 2% roztworze chitozanu w 2% kwasie octowym. Homogeniczną zawiesinę umieszczano w 50 ml strzykawkach (BD Perfusion), a następnie przetłaczano przez plastikowe dysze z wykorzystaniem pompy infuzyjnej (AP22, Ascor) do mieszającej się kąpieli 2% roztworu NaOH (rpm=800). Następnie uformowane krople płukano wodą destylowaną, odwadniano 96% alkoholem etylowym oraz poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej. Suchy granulaty poddawano nasączeniu w roztworze CaCl<sub>2</sub> w celu wprowadzenia jonów Ca<sup>2+</sup> odpowiedzialnych za sieciowanie alginianu i formowanie struktury 3D biomateriału po połączeniu z granulatkami CH/TCP. Materiał formowano poprzez połączenie granulek z roztworem alginianu w stosunku wagowym 1:2. W zaprezentowanej pracy przedstawiono badanie wpływu stężenia CaCl<sub>2</sub> oraz czasu imersji fazy stałej w roztworze jonów Ca<sup>2+</sup> na szybkość żelowania materiału.

Ocenę morfologii kompozytowego granulatu oraz uformowanego materiału dokonano technikami mikroskopowymi (mikroskop optyczny - Nikon Eclipse 80i oraz mikroskop elektronowy, Zeiss Supra). Czas żelowania oszacowano wykorzystując strzykawkę wyposażoną w dwa tłoki (RYS. 1). Badanie polegało na przetłaczaniu płynnej fazy alginianu przez granulki umieszczone wewnątrz strzykawki. Układ uznawano za żelowany, gdy wzrastający opór przepływu płynu przez warstwę granulek uwalnianych jony wapnia powodował gęstnienie alginianu i jednocześnie uniemożliwiał transport płynu przez granulaty. Czas żelowania mierzono stoperem. W celu przeprowadzenia badania do strzykawki wprowadzano 1,00 g granulek oraz 2 ml roztworu alginianu. Eksperymentalnie przebadano wpływ stężenia chlorku wapnia (1, 2, 10%) oraz czasu imersji granulek w roztworze (15 min, 24 h) na czas żelowania materiału.

The presented material was designed as a biphasic system, where solid phase was consisting of chitosan (CH)/β-tri-calcium phosphate (TCP) particles and a liquid one constituted of 2% solution of alginate salt [4,5]. The injectable system formation relied on calcium ions release from chitosan/TCP particles into liquid alginate phase that tends to form gel in presence of calcium ions.

## Materials and Methods

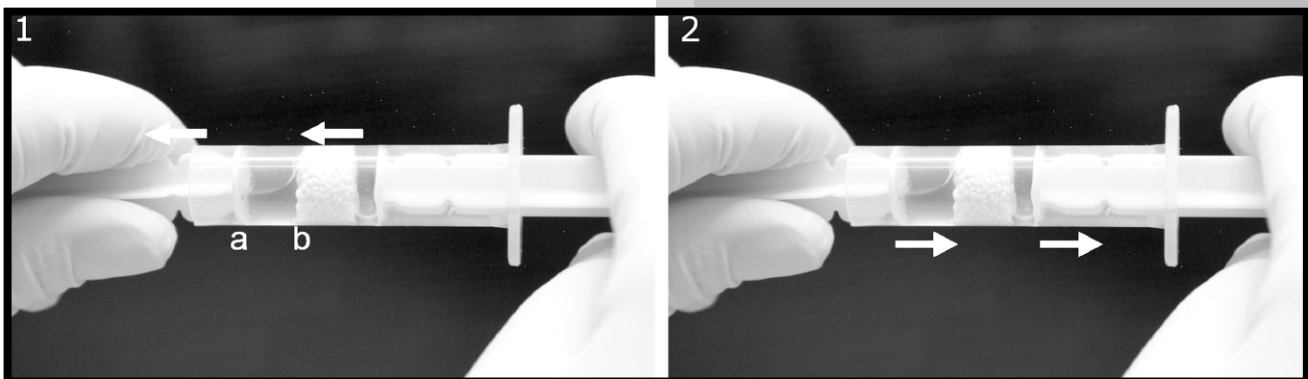
Chitosan (~95% degree of deacetylation) [1,6] was purchased from Medical Heppe GmbH, β-tri-calcium phosphate from Sigma Aldrich and alginate acid sodium salt from brown algae was purchased from Fluka.

Chitosan/β-tri-calcium phosphate beads were prepared by hydrodynamic formulation of CH/TCP solution in drop forming rate and were being collected into precipitation bath consisting of NaOH solution. Chitosan/β-TCP solution was prepared by suspending TCP powder in 2% chitosan in 2% acetic acid solution. The homogenous suspension was being placed in 50 ml syringe (BD Perfusion) and pressed out through the plastic nozzle using infusion pump (AP22, Ascor) into continuously stirring (rpm=800) 2% NaOH bath. Afterwards, the formulated beads were washed with distilled water and dehydrated with the use of 96% ethanol. In the next step, the granules were dried at room temperature.

Dried microspheres were immersed in CaCl<sub>2</sub> solution in order to enrich CH/TCP beads with Ca<sup>2+</sup> ions, so that the inorganic phase could constitute a carrier and source of cross-linking agent release for alginate gel formation. The injectable system was obtained by mixing CH/TCP beads with the liquid alginate in the following mass ratio 1:2. Calcium chloride concentration and immersion time were considered and studied in the hereby presented studies.

The morphological evaluation of composite CH/TCP particles and formed injectable system were performed by optical microscope Nikon Eclipse 80i and SEM analysis (Zeiss Supra). The gelling time of injectable system was evaluated with the use of double plunger syringe (FIG. 1). In order to determine the setting time liquid alginate phase was forced through the composite granule phase which was previously placed in the syringe. The system was assumed as gelling when resistance of the liquid phase flow increased preventing alginate transport through the beads and was measured as setting time with the use of timer. To conduct investigation 1.00 g of composite granules were placed into syringe and 2 ml of alginate acid sodium salt was added. Both the influence of calcium chloride concentration (1, 2, 10%) and time of soaking CH/TCP phase in the solution of calcium chloride were evaluated during the study.

**RYS. 1. Badanie czasu żelowania; a - faza płynna (alginian), b - faza stała (granulaty CH/TCP). FIG. 1. Setting time evaluation; a - liquid phase, b - solid phase (beads).**





Własności mechaniczne przebadano dokonując próby ściskania biomateriałów uformowanych w kształcie cylindrów. Przetestowano dwie generacje próbek: materiały uformowane, a następnie wysuszone (n=6) oraz materiały zwilżone alginianem, które poddano analizie natychmiast po ich uformowaniu (n=6). Badania przeprowadzono na uniwersalnym elektromechanicznym stanowisku MTS Q/test 10 (parametry pracy: obciążenie 10 kN, szybkość przesuwu tłoka 0,1 mm/s). Wartości modułu Younga zostały wyznaczone na podstawie kąta nachylenia odcinka prostoliniowego krzywych naprężenie-odkształcenie, a wytrzymałość na ściskanie określono jako pierwsze maksimum widoczne na krzywych.

Przeprowadzono także wstępne badania *in vivo* na modelu szczura opracowanych biomateriałów oraz materiału alloplastycznego dostępnego komercyjnie (granulat TCP/PLA) jako próbę kontrolną. Biomateriały implantowano do eksperymentalnie utworzonych defektów o średnicy 7 mm w czaszkach szczurów. Badaniu poddano 40 zwierząt, a analizę histologiczną przeprowadzono po 4 i 12 tygodniach dla obu grup materiałów.

## Wyniki i dyskusja

Granulat otrzymany na drodze hydrodynamicznego formowania przedstawiono na RYS. 2a,b,c. Ze względu na obecność nieorganicznej fazy fosforanowo-wapniowej powierzchnia cząstek jest chropowata i posiada dobrze rozwiniętą mikrostrukturę, co można stwierdzić na podstawie mikrofotografii uzyskanych przy pomocy SEM (RYS. 2c). Materiał wstrzykiwalny CH/TCP/Alg uformowany w postaci krążków, uprzednio wysuszony poddano obserwacjom w mikroskopie elektronowym (RYS. 2d,e,f). Warstwa alginianu pokrywająca granulat CH/TCP posiada gładką powierzchnię, która ma skłonność do pęknięcia ze względu na znaczną utratę wody w wyniku procesów suszenia. RYS. 2g,h,i prezentuje uformowany biomateriał z uwodnioną warstwą alginianu, obserwowany w mikroskopie optycznym. Od lewej odpowiednio, morfologia granulek CH/TCP (RYS. 2g) oraz uformowany CH/TCP/Alg biomateriał (RYS. 2h,i). Przeprowadzone badania dotyczące czasu żelowania materiału wykazały, że czas imersji w roztworze chlorku wapnia nie wpływał znacząco na szybkość formowania struktury, natomiast wraz z rosnącym stężeniem jonów wapnia obserwowano krótsze czasy żelowania (RYS. 3).

Mechanical properties concerning compression tests were studied on cylindrical shape samples. There were two generations of the biomaterials tested; the specimens, which were previously dried in the room temperature for 24 h (n=6) and samples which were tested in their "wet" form, immediately after material formation (n=6). The universal electromechanical testing set-up MTS Q/test 10 with work parameters: load 10 kN and constant speed of crosshead displacement 0.1 mm/s was used. Young modulus values were calculated from the slope of linear part of stress-strain curves and compressive strength was obtained from the first maximum of stress visible in the curves.

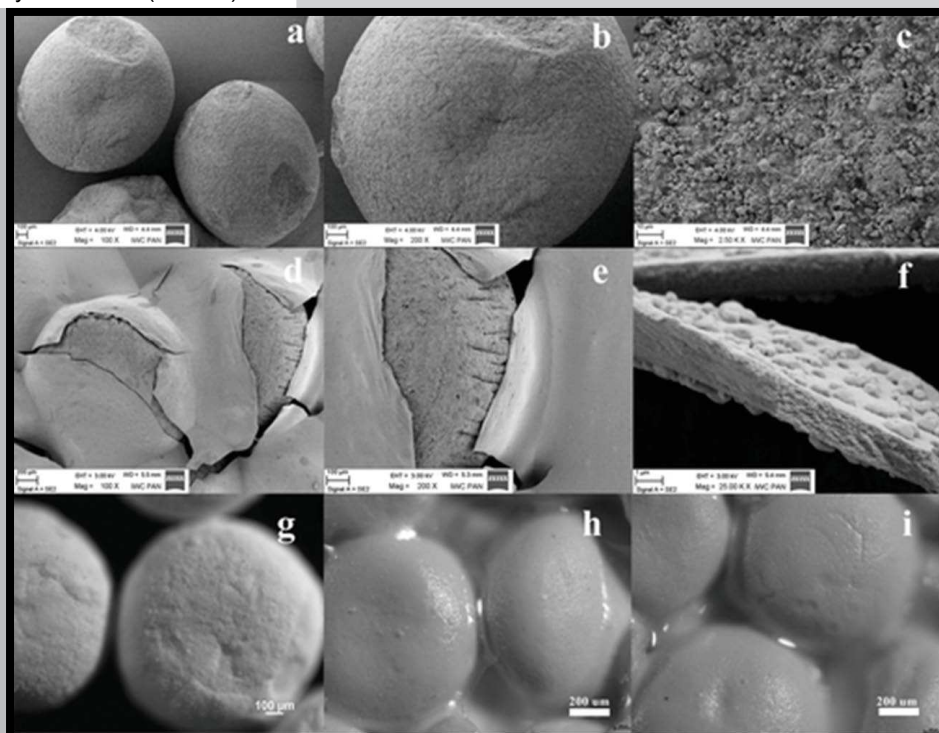
Preliminary studies concerning *in vivo* response to implanted biomaterial were conducted on the rat model. Both CH/TCP/Alg biomaterial and commercial product based on TCP microparticles were implanted into experimentally created critical-size (7 mm) defects in rats' skull. There were 40 rats subjected to the surgical procedure. Histological evaluation after implantation was conducted after 4 and 12 weeks.

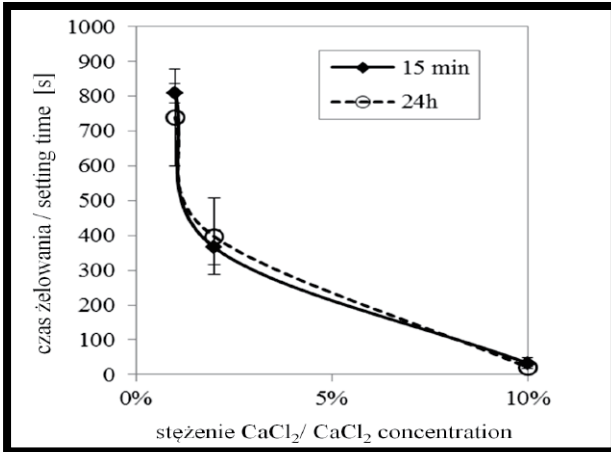
## Results and Discussion

Particles obtained by drop forming method are shown in the FIG. 2a,b,c. Due to incorporated inorganic calcium phosphate phase they possess rough surface with well-developed microstructure, what can be found by considering SEM microphotographs presented in FIG. 2c. Formed into cylindrical shape, previously dried, CH/TCP/Alg biomaterial was also analyzed by SEM and the pictures obtained are presented in the FIG. 2d,e,f. When compared with CH/TCP beads, alginic layer seems to possess smooth surface that tends to be fractured when material completely dried. FIG. 2g,h,i present photographs obtained by optical microscope. From the left hand side, respectively, morphology of CH/TCP microspheres (g) and formed injectable system covered with the layer of alginate gel (h, i). It was found that immersion time in  $\text{CaCl}_2$  did not influence setting time of the system, but on the other hand we have established that increasing concentration of cross-linker significantly diminished the time of material gelation (FIG. 3).

**RYS. 2. Morfologia i topografia granulatu CH/TCP, zdjęcia uzyskane z wykorzystaniem SEM (a,b,c); mikrofotografie uformowanego biomateriału CH/TCP/Alg (d,e,f); morfologia CH/TCP/Alg, mikroskop optyczny (g,h,i).**

**FIG. 2. Morphology and topography of CH/TCP particles obtained by SEM analysis (a,b,c); microphotograph of formed CH/TCP/Alg biomaterial (d,e,f); morphology of biomaterial observed by optical microscope (g,h,i).**





**RYS. 3.** Wpływ stężenia chlorku wapnia (1, 2, 10%) oraz czasu immersji (15 min, 24 h) na szybkość żelowania biomateriału.

**FIG. 3.** Effect of calcium chloride concentrations (1, 2, 10%) and immersion times (15 min, 24 h) on the setting time of injectable system.

Badaniu poddano dwie generacje materiałów uformowanych w kształcie cylindrów. Zarówno próbki uprzednio wysuszone, jak i świeżo uformowane, zwilżone hydrożelem alginianowym przeanalizowano podczas próby ściskania. Wyniki badań przedstawiono na RYS. 4. Materiały uprzednio suszone wykazywały bardziej sztywną strukturę ze względu na utratę elastyczności w wyniku odwodnienia hydrożelu alginianowego. Moduł Younga dla materiałów suchych osiągał wartości  $16,19 \pm 2,35$  MPa, a wytrzymałość na ściskanie wynosiła  $1,97 \pm 0,77$  MPa. W przypadku materiałów z żelem alginianowym zarówno moduł elastyczności, jak i wytrzymałość na ściskanie osiągały niższe wartości, odpowiednio  $9,54 \pm 0,62$  MPa i  $0,94 \pm 0,07$  MPa.

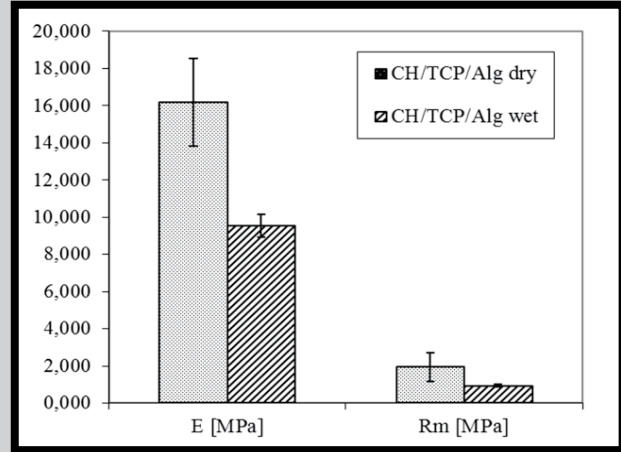
Analiza histologiczna przeprowadzona po 4 i 12 tygodniach od implantacji wykazała, iż w obu punktach czasowych obserwowano ogniska kościotworzenia wokół opracowanego samoorganizującego się biomateriału (RYS. 5a,c,e). Dla porównania, w przypadku materiału komercyjnie dostępnego odnotowano odpowiedź zapalną oraz brak aktywności osteokondukcyjnej wszczepu po 4 tygodniach i znikome ogniska kościotworzenia po 3 miesiącach (RYS. 5b,d,f).

## Wnioski

W niniejszej pracy zaproponowano formułację samoorganizującego się biomateriału otrzymanego z chitozanu, fosforanu wapnia oraz soli kwasu alginowego. Materiał przebadano pod względem morfologii, przeprowadzono analizę czasu żelowania w zależności od stężeń oraz czasu immersji granulat i wykazano istotny wpływ stężenia jonów wapnia na szybkość żelowania. Dokonano oceny własności mechanicznych materiału w zależności od uwodnienia alginianu. Wstępne badania *in vivo* przeprowadzone na modelu szczura wykazały efekt kościotworzenia, co pozwala pomyślnie wnioskować o potencjalnym zastosowaniu biomateriału do zastosowań w augmentacji kości.

## Podziękowania

Niniejsza praca jest finansowana przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka.



**RYS. 4.** Własności mechaniczne; E – moduł Young'a,

Rm – wytrzymałość na ściskanie.

**FIG. 4.** Mechanical properties; E – Young's modulus, Rm – compressive strength.

Two generations of the cylinder-shaped biomaterials were tested in order to evaluate mechanical properties of injectable system. Both dried samples and newly formed scaffolds wetted by alginic layer were subjected to the study. It was clearly found that "dry" specimens tend to possess stiffer architecture due to dried alginic phase covering beads surfaces, which lost its gel-like elastic structure during drying process. Young's modulus for "dry" materials reached out  $16,19 \pm 2,35$  MPa and the compressive strength amounted to  $1,97 \pm 0,77$  MPa. In the case of "wet" samples both elastic modulus and compressive strength obtained possessed lower values and reached out  $9,54 \pm 0,62$  MPa and  $0,94 \pm 0,07$  MPa, respectively.

*In vivo* studies on rat model revealed that after a month and three months from implantation there was newly formed bone observed around biomaterial. In comparison commercially available alloplastic material did not exhibit similar osteoconductive properties and revealed high inflammatory response without osteogenic activity (FIG. 5).

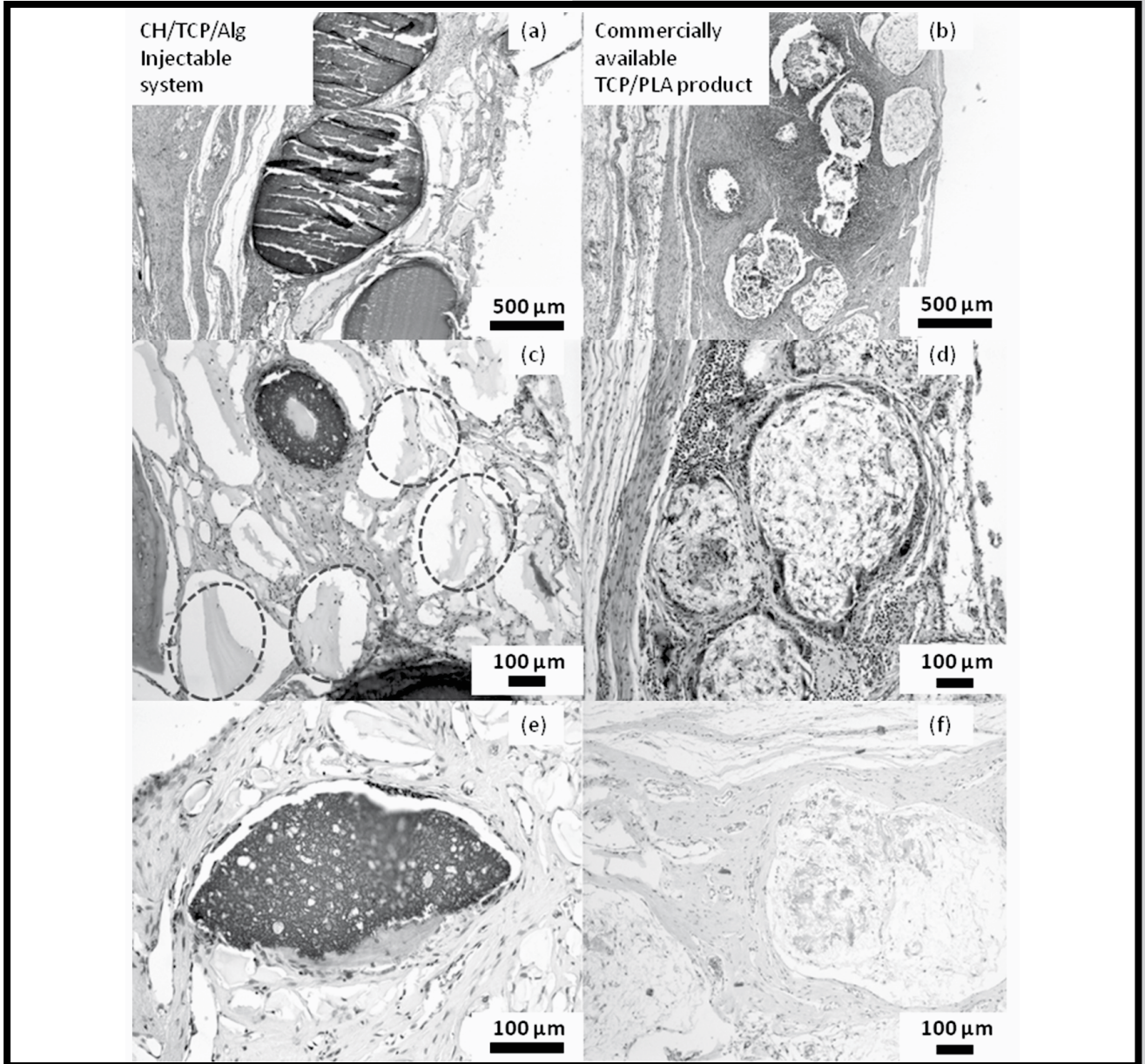
## Conclusions

In the hereby presented work formulation of self-setting biomaterial obtained from chitosan, calcium phosphate and alginate salt was proposed. The biomaterial was characterized as far as morphology evaluation, self-setting time with respect to calcium ions concentration and immersion time in the cross-linker solution. Mechanical properties were analyzed for dried and wetted biomaterials. Preliminary *in vivo* studies revealed osteogenic effect of formulated biomaterial, what might state about potential application for bone augmentation.

## Acknowledgements

This work was financially supported by Foundation of Polish Science in the frame of Innovative Economy Operational Programme.





**RYS. 5.** Analiza histologiczna po 4 i 12 tygodniach od implantacji biomateriału; a, c, e – wstrzykiwalny system CH/TCP/Alg; b, d, f – komercyjnie dostępny materiał alloplastyczny (TCP/PLA); c – ogniska kościotworzenia wokół opracowanego biomateriału, oznaczone kółkami; d – brak kościotworzenia wokół materiału komercyjnie dostępnego, obserwowano odczyn zapalny po 4 tygodniach od implantacji; e, f – badania po 12 tygodniach; e – uwapniona tkanka kostna wrastająca na powierzchnię materiału, f – niewielki efekt kościotworzenia dla materiału TCP/PLA

**FIG. 5.** Histological evaluation after 4 and 12 weeks from biomaterials implantation; a, c, e – CH/TCP/Alg injectable system, b, d, f – commercially available alloplastic material (TCP/PLA), respectively. (c) newly formed bone tissue around fabricated biomaterial observed after 4 weeks, sites marked by circles (d) lack of bone formation in the case of commercial product, inflammatory response, after 4 weeks; e, f – results obtained after 12 weeks, (e) newly formed, calcified bone tissue growing onto material surface, (f) slight bone formation around commercial material.

## Piśmiennictwo

- [1] Hsu S., Whu S. W., Tsai C. L., Wu Y. H., Chen H. W., Hsieh K. H.: Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Journal of Polymer Research* 11 (2) (2004) 141-147.
- [2] Khor E., Lim L. Y.: Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 24 (13), (2003) 2339-2349.
- [3] Kim I. Y., Seo S. J., Moon H. S., Yoo M. K., Park I. Y., Kim B. C., Cho C. S.: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26 (1), (2008) 1-21.

## References

- [4] Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J.: Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience* (2006) 623-633.
- [5] Zhensheng L., Hassna R. Ramaya, Kip D. Hauchb, Demin Xiaoc and Miqin Zhanga: Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26 (18), (2005) 3919-1928.
- [6] Ravi Kumar M.N.V, Muzzarelli R.A.A., et al.: Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Review*, (2004) 104, 12:6017-6084.