ENGINEERING OF BIOMATERIALOW NIERIA BIOMATERIALÓW

Journal of Polish Society for Biomaterials and Faculty of Materials Science and Ceramics AGH-UST Czasopismo Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów i Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH

Number 131 Numer 131 Volume XVIII Rok XVIII

APRIL 2015 KWIECIEŃ 2015

ISSN 1429-7248

PUBLISHER: WYDAWCA:

Polish Society for Biomaterials in Krakow Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

EDITORIAL COMMITTEE: KOMITET REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief Redaktor naczelny Jan Chłopek

Editor Redaktor Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial Sekretarz redakcji Design Projekt Katarzyna Trała Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

AGH-UST 30/A3, Mickiewicz Av. 30-059 Krakow, Poland Akademia Górniczo-Hutnicza al. Mickiewicza 30/A-3 30-059 Kraków

Issue: 250 copies Nakład: 250 egz.

Scientific Publishing House AKAPIT Wydawnictwo Naukowe AKAPIT e-mail: wn@akapit.krakow.pl



BI MATERIALS

EDITORIAL BOARD KOMITET REDAKCYJNY

EDITOR-IN-CHIEF Jan Chłopek - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

EDITOR Elżbieta Pamuła - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac - UNIVERSITY POLITEHNICA OF BUCHAREST, ROMANIA LUCIE Bacakova - Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic Romuald Będziński - WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Stanisław Błażewicz - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA Jan Ryszard Dąbrowski - Białystok Technical University, Poland Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY Małgorzata Lewandowska-Szumieł - Medical University of Warsaw, Poland Jan Marciniak - Silesian University of Technology, Zabrze, Poland Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM Stanisław Mitura - Technical University of Lodz, Poland Roman Pampuch - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Abhay Pandit - National University of Ireland, Galway, Ireland Stanisław Pielka - WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM Jacek Składzień - Jagiellonian University, Collegium Medicum, Krakow, Poland Andrei V. Stanishevsky - University of Alabama at Birmingham, USA Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Tadeusz Trzaska - University School of Physical Education, Poznań, Poland Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

BI MATERIALS

Wskazówki dla autorów

.

1. Prace do opublikowania w kwartalniku "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.

4. Struktura artykułu:

TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo

5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. 6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa

w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany. 7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem. 8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.

9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.

10. Adres redakcji:

Czasopismo

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61 tel./fax: (48) 12 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma: www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41 Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN Konto: Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 ING Bank Śląski S.A. O/Kraków nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" should be written in English.

2. All articles are reviewed.

3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.

4. A manuscript should be organized in the following order:

• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words)

Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References

5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Highresolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.

8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.

9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.

10. Address of editorial office:

Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61 tel./fax: (48) 12 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website: www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates: Cost of one number: 20 PLN Payment should be made to: Polish Society for Biomaterials 30/A3, Mickiewicz Av. 30-059 Krakow, Poland ING Bank Slaski S.A. account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

27th European Conference on Biomaterials

ESB2015

Π

30 August–3 September Kraków, Poland



ENGINEERING OF BIOMATERIALS

SPIS TREŚCI

CONTENTS

THE INFLUENCE OF MINERALIZATION CONDITIONS	THE INFLUENCE OF MINERALIZATION CONDITIONS
ON THE EFFECTIVENESS OF ENZYMATIC	ON THE EFFECTIVENESS OF ENZYMATIC
MINERALIZATION OF HYDROGELS	MINERALIZATION OF HYDROGELS
KRZYSZTOF PIETRYGA, KATARZYNA RECZYŃSKA,	KRZYSZTOF PIETRYGA, KATARZYNA RECZYŃSKA,
ELŻBIETA PAMUŁA 2	ELŻBIETA PAMUŁA 2
EFFECT OF POLYLACTIDE MODIFICATION	EFFECT OF POLYLACTIDE MODIFICATION
WITH β-TCP AND LECITHIN ON THE PROPERTIES	WITH β-TCP AND LECITHIN ON THE PROPERTIES
OF THE MATERIAL AS A SUBSTRATE	OF THE MATERIAL AS A SUBSTRATE
FOR OSTEOBLASTS	FOR OSTEOBLASTS
RADOSŁAW OLKOWSKI, AGATA STEFANEK, PIOTR KASZCZEWSKI,	RADOSŁAW OLKOWSKI, AGATA STEFANEK, PIOTR KASZCZEWSKI,
TOMASZ CIACH, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ,	TOMASZ CIACH, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ,
ILONA KALASZCZYŃSKA	ILONA KALASZCZYŃSKA
WPŁYW DOMIESZKI WĘGLA SZKLISTEGO	THE EFFECT OF A GLASSY CARBON ADDITIVE
DO CEMENTU CHIRURGICZNEGO NA JEGO	TO SURGICAL CEMENT ON ITS DURABILITY
TRWAŁOŚĆ I ADAPTACJĘ W ORGANIZMIE	AND ADAPTATION IN THE ORGANISM
ALICJA BALIN 12	ALICJA BALIN 12
OCENA BIOLOGICZNA IN VITRO NOWYCH	IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION
BIOMATERIAŁÓW STOMATOLOGICZNYCH	OF NEW DENTAL BIOMATERIALS
Zbigniew Jaegermann, Lidia Ciołek,	ZBIGNIEW JAEGERMANN, LIDIA CIOŁEK,
Ewa Zaczyńska, Anna Czarny 32	EWA ZACZYŃSKA, ANNA CZARNY 32

ATERIA J. Ľ Wersja papierowa czasopisma "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" jest jego wersją pierwotną PRINTED VERSION OF "ENGINEERING OF BIOMATERIALS / INŻYNIERIA BIOMATERIAŁÓW" IS A PRIMARY VERSION OF THE JOURNAL

Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego

Edition financed by the Minister of Science and Higher Education

THE INFLUENCE OF MINERALIZATION CONDITIONS ON THE EFFECTIVENESS OF ENZYMATIC MINERALIZATION OF HYDROGELS

Krzysztof Pietryga, Katarzyna Reczyńska, Elżbieta Pamuła*

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND *E-MAIL: EPAMULA@AGH.EDU.PL

Abstract

Polysaccharide hydrogels are widely used in food industry and medicine. Gellan gum (GG) recently gained a lot of attention as a promising material for tissue regeneration proposes due to its excellent biocompatibility and similarity to natural extracellular matrix. However, in unmineralized form it is not suitable for bone tissue engineering because of weak mechanical properties. Enzymatic mineralization (e.g. using alkaline phosphatase – ALP) is one of the methods of calcifying of hydrogels and it resembles natural processes occurring during bone healing.

The aim of this research was to investigate mineralization of hydrogels and to improve properties of gellan gum scaffolds by adjusting processing conditions. Since ALP does not form with GG covalent bonds, during incubation in mineralization medium (solution of calcium glycerophosphate - CaGP) it is diffusing from the samples. Therefore, mineralization effectiveness depends on the interplay between incoming CaGP and outgoing ALP molecules. We hypothesize that better CaGP availability, especially in the first hours of incubation, can result in more effective and homogenous precipitation of calcium phosphates (CaP) in GG samples.

To this end, samples with different GG and ALP concentration were subjected to two different mineralization regimes (more and less frequent CaGP exchanges). We proved that better CaGP availability (more frequent CaGP exchange) resulted in better mechanical properties (Young's modulus) and more effective mineral formation (higher dry mass percentage) of the samples compared to the same samples mineralized with lower accessibility of CaGP. This may be related to the fact, that in presence of fresh organic substrates, more CaP are formed in the outer parts of the samples at the beginning of the process, that limit ALP diffusion and allow more uniform mineralization.

Keywords: enzymatic mineralization, hydrogels, bone tissue engineering

[Engineering of Biomaterials 131 (2015) 2-7]

Introduction

Hydrogels are highly hydrated polymers that recently gained increasing interest for potential use in tissue engineering. Advantages of hydrogels include injectability, exact fitting to the defect site and easiness of incorporation of bioactive molecules and cells. Hydrogels have been mainly considered for applications in soft tissue engineering, but the versatility of hydrogels has resulted in increased interest in potential application of those materials in regeneration of bone and cartilage. However, hydrogels lack the capacity to calcify which limits their suitability for hard tissue regeneration [1-3].

A recent trend involves the development of hydrogels that possess the capacity to mineralize. Thanks to CaP presence within hydrogels, materials gain affinity for biologically active proteins. Mechanical reinforcement resulting from mineralization may help to overcome one of the main disadvantages of hydrogel materials, namely weak mechanical properties [4-5].

Hydrogels can be mineralized with several different ways: physically (by incorporation of inorganic calcium phosphate particles) [6], chemically (by incubation of hydrogels in solutions containing calcium and/or phosphate ions) [7] and enzymatically (by incorporation of enzymes) [8-10].

Alkaline phosphatase (ALP) is an enzyme involved in mineralization of bone by cleavage of phosphate from organic phosphate (e.g. calcium glycerophosphate, CaGP). In previous studies ALP was used to induce mineralization of hydrogels to improve their mechanical strength and render them more suitable for bone replacement applications [11].

Physical and biological properties of enzymatically mineralized gellan gum (GG) hydrogels with a focus on bone regeneration applications were studied by Douglas et al [11-12]. In these studies ALP was incorporated into hydrogel without any covalent bonding therefore it could easily diffuse outside. This method of ALP incorporation does not involve reactive and potentially harmful chemicals. However its main disadvantage is poor retention of ALP in material during the process of mineralization. It can be a limiting factor for achieving higher degree of mineralization. In all previous studies maximal content of CaP precipitates inside hydrogels did not exceed 10-12%. Moreover as it was shown in our previous study, fast diffusion of ALP from outer parts of hydrogels lead to inhomogeneous mineralization - the samples were less mineralized on the surface due to ALP loss. It was also noted that ALP released to the surrounding solution consumed CaGP and as a result CaP precipitated outside hydrogels. We assume that this phenomenon might reduce efficiency of enzymatic mineralization. It is particularly present in the first hours of incubation, because by that time considerable amount of the enzyme is released from the samples [12-13].

The aim of this study was to find out how to prevent outside mineralization and sustain steady influx of CaGP into the hydrogel in the first hours of mineralization, while it possess the highest mineralization capability due to high ALP concentration within the material.

We also wanted to measure a rate of ALP release from hydrogel during mineralization and compare it to diffusion of ALP from unmineralized hydrogel. We believe that CaP precipitation inside hydrogel may partially prevent enzyme loss and mineralization can sustain longer.

In this experiment we evaluated the influence of mineralization conditions on its effectiveness in the case of the samples with different GG and ALP concentrations. Two CaGP exchange regimes were applied. The main hypothesis was that more frequent CaGP exchange in the first day of incubation results in more efficient CaP formation within GG samples.

.

Materials and Methods

Materials

Aqueous solutions of GG (Gelzan[™] CM, Sigma-Aldrich), alkaline phosphatase from bovine intestinal mucosa, lyophilized powder (ALP, P7640, Sigma-Aldrich) and calcium chloride (CaCl₂, POCH) were used. GG was mixed with UHQ-water, heated up to 90°C until complete dissolution and then cooled down to 50°C. CaCl₂ and ALP were dissolved in UHQ-water and heated up to 50°C. GG solution was first mixed with ALP and then CaCl₂ solution was added. After short mixing gel was purred into test tubes and left to gellify (4°C, 5 min).

Samples for ALP release measurement

To measure release rate of ALP from 0.7% GG during mineralization as well as from non-mineralized gel, two sets consisting of three types of samples were prepared. In the first set ALP was released to water, while in the second one to CaGP solution and at the same time gel underwent mineralization (FIG. 1.1). All samples were prepared in 10 ml test tubes. 2 ml 0.7% GG gel containing 2.5 mg/ml ALP and 0.03% CaCl₂ was poured into test tube.

Samples for physicochemical examination

Solutions were prepared in the same way as described before. Final concentrations of GG, ALP and CaCl₂ in samples are given in TABLE 1. For each sample group 8.8 ml GG, 0.2 ml of ALP and 1 ml CaCl₂ solutions were vigorously mixed, casted into Petri dish (10 cm diameter) and cooled down to 4°C. Samples (12 mm diameter and 4 mm height) were cut using a hole punch. For mineralization samples were then immersed in 0.1 M CaGP solution (Sigma-Aldrich). For each sample group two CaGP exchange regimes were used: A (2 h, 4 h, 6 h, 1 day, 3 days and 5 days) and B (1 day, 3 days and 5 days). After 7 days the samples were washed in UHQ-water and subjected to physicochemical examination. Preparation procedure is shown in FIG. 1.2.

Methods

ALP release measurement

Samples were prepared in 10 ml test tubes. Each 2 ml sample of GG gel after gellation was covered with 1 ml of UHQ-water or 0.1 M CaGP. Solution was exchanged after: 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 1 day and 3 days. Solution collected from each changing period was centrifuged at 3000 rpm for 4 min to separate CaP precipitating outside hydrogels. 600 µl of supernatant was collected and dried (37°C for 3 days), remaining precipitate was dissolved in 200 µl UHQwater. 60 µl of this solution was transferred to 96-well plate in triplicate for each sample and mixed with 60 µl of BCA reagent (5 ml bicinchoninic acid solution, 20 mg of copper II sulfate anhydrous pure - both from Sigma-Aldrich and 500 µl H₂O). To determine a real concentration standard solutions of ALP were also prepared. After 30 min incubation absorbance at 562 nm was measured. Real concentration was calculated on the basis of calibration curve and known dilutions.

Mechanical testing

Mineralized hydrogels were subjected to compression testing using ZWICK 1435 (Zwick Roell, Germany). Hydrogels were placed between piston heads and displacement was applied at a rate of 1 mm/min until the samples were compressed to 10% of their original height. Young's modulus was determined based on the stress-strain curve. For each sample group 4 samples were tested.

TABLE 1. Final concentrations of GG, ALP and CaCl, in samples.

GG [% (w/v)]	ALP [mg/ml]	CaCl ₂ [% (w/v)]
0.40		
0.55	0.5	
0.70		0.03
	0.25	0.03
0.70	0.50	
	2.50	



FIG. 1. Manufacturing of GG samples with incorporated ALP for ALP release measurements (1) and physicochemical testing (2).

Measurement of dry mass percentage

Prior to compressive strength testing wet samples were weighted, dried for 48 h and then weighted again. Dry mass percentage was calculated as follows: (weight after incubation and subsequent drying)/(weight after incubation before drying) * 100. For each sample group 4 samples were tested.

Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) were performed using Nova NanoSEM 2000 (FEI, USA). Prior to analysis, samples were lyophilized and coated with a thin carbon layer. Micrographs were obtained with 5 kV accelerating voltage.

Results

ALP release measurement

The aim of ALP release measurements using BCA method was to evaluate the influence of mineralization process on a rate of ALP diffusion from hydrogel and to find out how mineral phase deposition interfere with this process. Release kinetics of ALP from hydrogel containing 0.7% GG and 2.5 mg/ml ALP is shown in FIG. 2. Regardless of the surrounding medium (water or CaGP) enzyme release was the most intensive in the first hours of incubation.

The amount of ALP released to water was much pronounced as compared to the hydrogel soaked in CaGP and mineralized. The differences in release rate between those two sample groups were most noticeable in the first hours of the experiment, i.e. after the first hour the amount of ALP released from soaked in UHQ-water hydrogel was 3 times higher than from that soaked in CaGP one, but between 8 h and 20 h it was only about 1.5 times higher.

Mechanical testing

FIG. 3 shows Young's modulus (E) of mineralized hydrogels with different GG (a) and ALP (b) concentrations. For all sample groups E was higher when samples were mineralized using regime A (more frequent CaGP exchange). Those differences were most significant in samples with lower GG concentration (0.4% and 0.55% GG). In the case of 0.7% GG with 0.25 and 2.5 mg/ml ALP the influence of CaGP exchange regime was not significant. Regarding the influence of GG concentration, when regime B was applied, the stiffness of mineralized hydrogels increased with growing GG concentration. However, when regime A was used, there was no difference between samples containing 0.55% and 0.7% GG. Surprisingly, the increase in ALP concentration did not result in improvement in mechanical properties of the samples. Young's modulus was the highest in the samples containing 0.5 mg/ml ALP, whereas those with 0.25 and 2.5 mg/ml ALP had almost two times lower stiffness.



FIG. 2. Amount of ALP released from hydrogel to water and to CaGP during mineralization.



FIG. 3. Young's modulus of mineralized hydrogels with different GG (a) and ALP (b) concentrations; statistically significant difference in comparison to other groups with *P <0.05 or **P<0.01.







FIG. 5. SEM images (a, b) and EDX analysis (c, d) of non-mineralized (a, c) and mineralized (b, d) hydrogels.

Dry mass percentage

The amount of mineral formed during incubation in CaGP can be assessed by dry mass percentage measurements. The more effective mineralization, the more CaP precipitated within hydrogel and the higher dry mass percentage was observed. FIG. 4 shows dry mass percentage of mineralized hydrogels with different GG (a) and ALP (b) concentrations. Regime A resulted in more effective mineral precipitation than regime B, however those differences were not as distinct as in the case of Young's modulus. What can be expected, the increase in GG concentration did not cause significant increase in dry mass percentage, since the contribution of GG mass was negligible compared to the mass of CaP formed within the samples. Statistically significant differences were found only between samples containing 0.4% GG and samples with 0.55% GG and 0.7% GG mineralized using regime B. With increasing ALP concentration, dry mass percentage was also growing for both mineralization regimes.

Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

FIG. 5 shows SEM images of hydrogel containing 0.7% GG and 0.5 mg/ml ALP before (FIG. 5a) and after 7-day mineralization (FIG. 5b) according to regime A. Before mineralization hydrogel had smooth and uniform surface whereas after mineralization numerous precipitates can be seen on the surface. Size of majority of these precipitates is below 1 μ m. EDX analysis (FIG. 5d) confirmed that precipitates consisted of calcium and phosphorus.

Discussion

Enzymatic mineralization of hydrogel is based on the reaction of disconnection of orthophosphate group from CaGP and formation of insoluble CaP. The reaction is catalyzed by enzyme, e.g. alkaline phosphatase (ALP), which is incorporated in hydrogel, but is not covalently bond to the polymer matrix. Therefore ALP diffusion from hydrogel is an important factor that can influence the effectiveness of mineralization. Other variables that should be also considered in term of mineralization process are: enzyme concentration and its activity, rate of CaGP diffusion into the hydrogel and hydrogel concentration. The assumption is that mineralization should be more effective in the case of higher ALP concentration and/or better substrate (CaGP) availability. Higher gellan gum concentration can also affect mineralization by obstructing reagents diffusion and limiting space for CaP precipitation. Furthermore, the influence of growing mineral deposits should be also considered as a diffusion barrier.

Previous experiments [11] showed nonuniform mineralization of hydrogels – less CaP was formed on the surface than in the middle of the samples. This phenomenon was related to high rate of ALP release and in consequence less effective mineral formation, especially in the outer parts of the samples. The aim of our study was to evaluate the influence of different parameters of both mineralization conditions and compositions of the samples on the effectiveness of the mineralization process.

The results of ALP release studies show that enzyme diffusion is the most intensive in the first hours of incubation, which makes that time crucial for the outcome of mineralization process. Just after immersing the sample in CaGP solution or water, gradient of ALP concentration is the highest and enzyme diffusion is fast and unhindered. With time passage, precipitation of CaP inside hydrogel creates a diffusion barrier and hampers ALP release - this is shown by the difference in ALP release between mineralized and non-mineralized sample (FIG. 2). However, it is not possible to completely impede ALP diffusion by rapid mineralization as it was shown for sample mineralized in the test tube. In this case there was still significant ALP release in the first hours of the process. Two gel samples - one incubated in water and one in CaGP - are two extreme conditions of mineralization: in the first case there is no substrate influx - only ALP release, in the second mineralization rate is maximal and unaffected by enzyme loss (ALP is replenished by enzyme diffusing from deeper parts of cylindrical samples). Real mineralization conditions are always somehow between these two extreme cases. If mineral formation is slow at the beginning of the process (less CaGP available), the situation resembles more the unmineralized system (incubated in water), but when CaGP is exchanged very often, fast rate of precipitation of CaP can limit enzyme release. Therefore, it is very important to prevent irreversible ALP loss in the first hours of the process in order to obtain uniformly mineralized hydrogels. Constant influx of CaGP might be provided by a perfusion device, however in that case ALP would be leached out more extensively during this process.

Considering abovementioned observations, mineralization of gellan gum with different GG and ALP concentration was conducted using two regimes - A (more frequent CaGP exchange) and B (less frequent CaGP exchange). In all cases, regime A resulted in more effective mineralization compared to regime B for the same samples, as evidenced by higher Young's modulus and dry mass percentage. Surprisingly, in the samples with variable GG concentration, there was a significant difference in stiffness between samples mineralized with different regimes, but they did not correspond to dry mass of those samples (FIG. 3a and 4a). To explain this phenomenon, the CaP distribution within the hydrogel should be considered. Hydrogels mineralized with regime B had less mineral formed on the surface. Outer parts of the samples are softer and during compression test they can strongly affect the results, however after drying as the volume of this part is relatively small, it does not contribute significantly to total mass of the sample.

Regarding samples with different ALP content, discrepancies in Young's modulus and dry mass percentage are also noticeable. Noteworthy, mechanical properties of hydrogels containing 2.5 mg/ml ALP are much lower than those with 0.5 mg/ml ALP (regardless of mineralization regime). The cause of that drop in Young's modulus might be due to disturbance of hydrogel structure by too many ALP molecules available. In the case of hydrogels with 0.5 mg/ml ALP, for 1 mg of the enzyme there are 14 mg of GG, while in the case of samples with 2.5 mg/ml ALP, there are only 2.8 mg of GG. On the other hand, in samples with lower ALP concentration (0.25 mg/ml) mineralization rate was slower and therefore not limited by substrate influx. Mineralization regime did not affect properties of those samples as it was noticed in other groups.

Conclusion

Based on the conducted experiments, we can confirm that our hypothesis was correct and that better substrate availability can result in more effective and uniform mineralization of gellan gum. Properties of mineralized hydrogels can be also altered by adjusting ALP and GG concentrations. The most effective mineralization was observed in hydrogels containing 0.55% GG and 0.5 mg/ml ALP mineralized by regime A (more frequent CaGP exchange).

References

[1] Douglas T.E., Pamula E., Leeuwenburgh S.C.: Biomimetic Mineralization of Hydrogel Biomaterials for Bone Tissue Engineering. Biomimetics: Advancing Nanobiomaterials and Tissue Engineering (2013) 51-67.

[2] Stevens M.M.: Biomaterials for bone tissue engineering. Materials today 11 (2008) 18-25.

[3] Gkioni K., Leeuwenburgh S.C., Douglas T.E., Mikos A.G., Jansen J.A.: Mineralization of hydrogels for bone regeneration. Tissue Engineering Part B: Reviews 16 (2010) 577-585.

[4] Morris E.R., Nishinari K., Rinaudo M.: Gelation of gellan -A review. Food Hydrocolloids 28 (2012) 373-411.

[5] Tang J., Tung M.A., Zeng Y.: Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono-and divalent cations. Carbohydrate Polymers 29 (1996) 11-16.

[6] Pereira D.R., Canadas R.F., Silva-Correia J., Marques A.P., Reis R.L., Oliveira J.M.: Gellan gum-based hydrogel bilayered scaffolds for osteochondral tissue engineering. In: Key Engineering Materials (2014) 255-260.

[7] Taguchi T., Sawabe Y., Kobayashi H., Moriyoshi Y., Kataoka K., Tanaka J.: Preparation and characterization of osteochondral scaffold. Materials Science and Engineering: C 24 (2004) 881-885. Acknowledgements

This study was supported by AGH University of Science and Technology, statute investigation 11.11.160.616.

The authors want to acknowledge Beata Kolecka and Katarzyna Pach from AGH University of Science and Technology in Kraków, Poland for technical assistance.

[8] Filmon R., Basle M., Barbier A., Chappard D.: Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: A composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 11 (2000) 849-868.

[9] Filmon R., Grizon F., Basle M., Chappard D.: Effects of negatively charged groups (carboxymethyl) on the calcification of poly (2-hydroxyethyl methacrylate). Biomaterials 23 (2002) 3053-3059.
[10] Beertsen W., Van den Bos T.: Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. Journal of Clinical Investigation 89 (1992) 1974.

[11] Douglas T.E., Messersmith P.B., Chasan S., Mikos A.G., de Mulder E.L., Dickson G., et al. Enzymatic mineralization of hydrogels for bone tissue engineering by incorporation of alkaline phosphatase. Macromolecular bioscience 12 (2012) 1077-1089.

[12] Douglas T., Wlodarczyk M., Pamula E., Declercq H., Mulder E., Bucko M.M., et al.: Enzymatic mineralization of gellan gum hydrogel for bone tissue-engineering applications and its enhancement by polydopamine. Journal of tissue engineering and regenerative medicine 8(11) (2014) 906-918.

[13] Pietryga K., Costa J., Pereira P., Douglas T.E.L., Pamuła E.: Promotion of bone cells growth on gellan gum hydrogels by enzymatic mineralization. Engineering of Biomaterials 125 (2014) 6-12.

• • • • • • • • • • • • • • • •

EFFECT OF POLYLACTIDE MODIFICATION WITH β-TCP AND LECITHIN ON THE PROPERTIES OF THE MATERIAL AS A SUBSTRATE FOR OSTEOBLASTS

Radosław Olkowski^{1,3,4}, Agata Stefanek², Piotr Kaszczewski³, Tomasz Ciach², Małgorzata Lewandowska-Szumieł^{3,4}, Ilona Kalaszczyńska^{3,4*}

¹ DEPARTMENT OF PATHOLOGY, CENTER FOR BIOSTRUCTURE RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
ul. CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND
² BIOMEDICAL ENGINEERING LABORATORY, FACULTY OF CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
ul. WARYŃSKIEGO 1, 00-645 WARSAW, POLAND
³ DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY, CENTER FOR BIOSTRUCTURE RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
ul. CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND
⁴ CENTRE FOR PRECLINICAL RESEARCH AND TECHNOLOGY,
ul. BANACHA 1B, 02-097 WARSAW, POLAND
*IKALASZCZYNSKA@WUM.EDU.PL

Abstract

Polylactide (PLLA) containing β-TCP is biodegradable composite and an attractive biomaterial for bone tissue engineering, however, hydrophobicity of PLLA based composites is major limitation for their use as scaffolds for cell culture. In our study lecithin was used to improve hydrophilicity and cytocompatibility of PLLA/β-TCP composite. Thin films of PLLA, PLLA/ β-TCP and PLLA/β-TCP/lecithin were manufactured by solvent-casting technique. Comparative analysis of all types of films was performed. Addition of *β*-TCP did not change hydrophilicity of PLLA. The hydrophilicity of PLLA/β-TCP/lecithin increased in comparison to PLLA and PLLA/β-TCP. Degradation of PLLA/β-TCP composite surpassed the degradation of PLLA while addition of lecithin diminished the degradation of composite. The cytocompatibility of composites were studied in 7 day long in vitro assay. Human bone derived cells were seeded on all tested surfaces. Cell viability was estimated by Live/Dead fluorescent staining and Alamar Blue test. Surprisingly, although lecithin addition improved hydrophilicity of the PLLA-based composite, adhesion and proliferation of human bone derived cells were markedly hampered on PLLA/β-TCP/lecithin in comparison to PLLA and PLLA/β-TCP. Despite positive effect we found of lecithin addition on hydrophilicity and stability of PLLA-based composite, its effect on cell attachment and proliferation is negative. Hence, incorporation of lecithin did not improve properties of PLLA/β-TCP/lecithin composite intended for bone tissue regeneration.

Keywords: polylactide, lecithin, osteoblasts, scaffold, bone tissue engineering

[Engineering of Biomaterials 131 (2015) 8-11]

Introduction

Current strategies of tissue engineering are focused on the combination of cells with supportive scaffolds. The biomaterials used to fabricate the scaffolds need to be compatible with the cells used for tissue regeneration. Polylactide (PLLA) is a polymer commonly used for scaffold manufacturing for bone tissue regeneration. The main advantage of PLLA is its resorbability. However, significant hydrophobic properties of this material are a cause of poor cell adhesion and its main limitation in bone tissue engineering applications [1]. Moreover, PLLA can elicit an inflammatory response from the host tissue due to its acidic products of degradation [2,3]. Thus, modifications of PLLA by other components admixing or surface modification is desired to improve its properties as a biomaterial for bone regeneration. One of the known and well defined bioactive and osteoconductive ceramic which improve the scaffold properties is β -tricalcium phosphate (β -TCP). Its addition to PLLA allows stabilization of degradation and improvement of biocompatibility in tissue engineering applications [4-6]. Although the PLLA composite with β -TCP is well established and presents higher cytocompatibility in vitro than pure PLLA, it remains hydrophobic and unfavorable for cell adhesion and proliferation. Addition of lecithin natural amphiphilic phospholipid - was shown to improve hydrophilicity and cytocompatibility of PLLA [7]. Therefore, we hypothesized that addition of lecithin to PLLA/β-TCP composite will improve its properties important for application in bone tissue engineering. The physical properties and in vitro degradation of the PLLA, PLLA/β-TCP and PLLA/β-TCP/lecithin films were investigated. Further, to test the biocompatibility of the composites, human bone derived cell (hBDC) culture in vitro was performed.

Materials and Methods

Preparation of PLLA films

Polylactide (PLLA) of medical purity (Purasorb PL 24, Purac) was dissolved in the 1:1 (v/v) mixture of chloroform (Carlo Erba) and dichloromethane (Chempur) to obtain 30% (w/v) solution. The PLLA solution was used directly to form films and also to prepare other composite materials: PLLA/β-TCP and PLLA/β-TCP/lecithin. The PLLA/β-TCP suspension was prepared by suspending 3 g of β-tricalcium phosphate (Sigma Aldrich) in 100 ml of 30% (w/v) PLLA solution. The PLLA/β-TCP/lecithin solution was prepared by suspending 3 g of β -tricalcium phosphate (Sigma Aldrich) and 1.5 g of lecithin (Serva) in 100 ml of 30% (w/v) PLLA solution. All PLLA suspensions were mixed vigorously for 24 h before use. The PLLA, PLLA/β-TCP, PLLA/β-TCP/ lecithin films were formed by pouring the suspension onto a clean glass and forming a layer of controlled thickness (50 µm) using the Elcometer 3700. Films were dried at 37°C until total solvent evaporation and peeled-away. Circles of the diameter 6 mm were cut from the obtained films and used for further experiments and cell culture.

Contact angle study

The contact angle was measured for all three types of obtained PLLA films: PLLA, PLLA/ β -TCP, PLLA/ β -TCP/ lecithin by the use of goniometer (CAM 200, KSV) and the Attension Theta Software (ver. 4.1.0., Biolin, Scientific).

BI MATERIALS

Materials hydrolysis measurement

The composite hydrolysis time was measured for all three types of obtained materials. The 4 circles from each type of PLLA-based films were prepared according to the described protocol. Each circle was incubated in the 50 ml of PBS solution (pH = 7.4) with addition of sodium azide (0.1% w/v) at 37°C in closed container for 4 weeks. The PBS solution was changed every week. After 4 weeks circles were dried until constant mass at 37°C and weighted.

Cell culture

Cytocompatibility of materials was tested in vitro on human bone-derived cells (hBDC) isolated from pieces of bone explanted postsurgery. HBDC isolation was performed according to the protocol described previously [8] and was approved by the Local Ethics Committee of the Medical University of Warsaw. Briefly, pieces of bone were cleaned of the connective tissue, cut into fragments of diameter 1-2 mm, rinsed with PBS (Life Technologies) and incubated overnight on magnetic stirrer in medium containing collagenase (Sigma-Aldrich) at 37°C. Bone fragments were then rinsed in PBS, moved into the culture bottles and incubated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 10% addition of Foetal Bovine Serum, 1% L-glutamine, 1% Antibiotic-Antimycotic (all media from Life Technologies) and ascorbic acid (30 µg/ml; Sigma-Aldrich). HBDC were cultured in vitro up to the state of subconfluence, i.e. until cells covered 70-80% of available area in culture bottles. Prior to the experiments cell culture was rinsed with PBS. HBDC were then consecutively incubated in collagenase solution for 20 min., rinsed with PBS and detached from the support with trypsin (Life Technologies).

Samples of biomaterials were placed into wells of 96well plate and seeded with hBDC. Density of cell seeding was 18 000 cells per cm² for Live/Dead staining and 36 000 cells per cm² for Alamar Blue assay. *In vitro* culture was continued in DMEM-based medium supplemented with ascorbic acid described above.

Live/Dead staining

HBDC cultured on biomaterial samples for 24 hours were visualized by fluorescent staining with Live/Dead kit (Life Technologies). Living cells converted calcein acetoxymethyl ester into calcein producing green fluorescence. Membrane-impermeant ethidum homodimer-1 labels nucleic acids of membrane-compromised dead cells with red fluorescence. Samples seeded with stained hBDC were observed in fluorescent microscope (Nikon, Japan).

Viability assay

HBDC viability was analyzed by Alamar Blue assay (Life Technologies) [9]. Metabolic activity of living cells is proportional to their redox potential, measured as cell ability to reduce blue, non-fluorescent resazurin to red, fluorescent resorufin. Fluorescence of reaction products was quantified in the ELISA reader (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Germany).

Results and discussion

Contact angle study

The water contact angles of the prepared PLLA films were measured to evaluate the influence of the lecithin addition on the PLLA surface wettability. The results of the contact angle measurements of the three types of materials produced are presented in FIG. 1. The contact angles of the PLLA and for PLLA/ β -TCP samples are similar (77° and 79° respectively), thus the addition of the β -TCP has no influence on the surface wettability. As it was expected the value of the PLLA/ β -TCP/lecithin surface contact angle is significantly lower (53°) than the contact angle for the PLLA and PLLA/ β -TCP surfaces.

Materials hydrolysis

The weight loss of the materials during 4 weeks of incubation in PBS solution is presented in TABLE 1. As it is shown, weight loss of the PLLA/ β -TCP composite was significantly higher than of pure PLLA (p>0.05). Interestingly, acceleration of composite degradation was evened out by lecithin addition (p>0.05). Obtained results were unexpected since in majority of reports, addition of ceramic, e.g. aragonite/vaterite [10], β -TCP [11] to PLLA is shown to slow down the rate of degradation of the polylactide.



FIG. 1. Contact angle measurements of water droplets on PLLA (A), PLLA/ β -TCP (B) and PLLA/ β -TCP/ lecithin (C) surfaces.

However, this opinion is not univocal since other authors showed that addition of β -TCP to PLLA increases rate of hydrolysis and the process depends on β -TCP concentration [12]. Degradation of polylactide and its composites depends on various factors such as configurational structure, copolymer ratio, crystallinity, molecular weight, morphology, porosity (reviewed in [13]). Therefore, heterogeneity of investigated materials, applied methodology and methods of degradation analysis may explain discrepancies between obtained results (TABLE 1) and reports in literature.

TABLE 1. Degradation rate of the PLLA materials expressed as mean (\pm standard deviation) weight loss after 4 weeks of incubation in PBS solution, *p<0.05.

Sample	Weight loss [%]
PLLA	6.3 ±0.9
PLLA/β-TCP	9.1 ±0.6*
PLLA/β-TCP/lecithin	7.2 ±2.3*

Viability of hBDC seeded on biomaterial discs

The addition of the 1.5% lecithin improves the hydrophilicity of material surface. Therefore we expected that biocompatibility of the PLLA/ β -TCP/lecithin composite will increase as well. Live/Dead staining showed numerous, well spread, alive hBDC on control culture surface as well as on PLLA and PLLA/ β -TCP films (FIGs. 2A, B and C). PLLA/ β -TCP/ lecithin films turned out to be the least cytocompatible – alive cells were less numerous (FIG. 2D). Moreover, presence of spherical and propidium iodide positive hBDC indicated increased cell death. Quantitative Alamar Blue test confirmed the microscopic observations. Results from day 1 suggest that adhesion of cells to PLLA was less efficient than to control polystyrene surface (p<0.05, FIG. 3). In this study, addition of β -TCP improved adherence of hBDC which was not significantly different from that of the control. However, blending the lecithin to the composite reversed positive effect of β -TCP resulting in less than 50% of seeded cell attached to the surface in comparison to control (p<0.001). HBDC cultured on PLLA and PLLA/ β -TCP films showed similar growth dynamic with significant increase in cell number between day 1 and 7, reaching cell numbers higher than in the control. In contrast, the proliferation of cells, on PLLA/ β -TCP/lecithin was significantly hampered and did not change from day 1 of the experiment (FIG. 3).

Decrease in adhesion and proliferation of hBDC on PLLA/β-TCP/lecithin surface were surprising, particularly in view of obtained results showing that addition of lecithin influences increase in hydrophilicity of composite. Xu et al. reported that PLLA containing 5% lecithin were more favorable for mesenchymal stem cells proliferation than pure PLLA or PLLA containing 10% or 15% lecithin [14]. However, searching for explanation of unexpected results we consider influence of external factors, such as light and temperature, on the stability of lecithin. Further, lecithin - unsaturated fatty acid, may undergo oxidation under atmospheric air to form lipid hydroperoxides, resulting in the impairment of its bioactivity and toxicity toward cells [15]. Other possible explanation of low adhesion and impaired proliferation of hBDC is the formation of harmful chemical or physical complexes (microparticles, micelles) of lecithin and calcium phosphate, since lecithin contains phosphoric acid group able to interact with calcium cations. Further, lecithin addition may change mechanical properties of the material [7].



FIG. 2. Analysis of viability of hBDC seeded on culture plastic (A), PLLA (B), PLLA/ β -TCP (C) and PLLA/ β -TCP/lecithin (D) surfaces. Pictures taken 24 h after seeding.



FIG. 3. Viability of hBDC measured by Alamar Blue assay. Data expressed in relative fluorescence units. Error bars show standard deviation. One-way analysis of variance with Tukey's multiple comparisons test was performed to evaluate differences among groups. ** p<0.01, * p<0.05, ns – not significant, lec – lecithin.

Reduced cell attachment and spreading on softer substrata is a known phenomenon [16]. Therefore, surface with higher lecithin concentration, characterized by lower stiffness, might be more beneficial for cell types derived from tissues of low rigidity, but not osteoblasts.

The main message from our study is that despite positive effect of lecithin on surface hydrophilicity, it can have negative effect on cell attachment and proliferation. Therefore functionalization of composites with lecithin may not always be beneficial. These studies have uncovered new unexpected results which need to be addressed further, such as elucidation of lecithin properties as an additive for improvement of composite hydrophilicity.

References

[1] Ma Z.W., Gao C.Y., Juan J., Ji J., Gong Y.H., Shen J.C.: Surface modification of poly-L-lactide by photografting of hydrophilic polymers towards improving its hydrophilicity. J Appl Polym Sci 85 (2002) 2163-2171.

[2] Thomas K.A., Toth J.M., Crawford N.R., Seim H.B., 3rd, Shi L.L., Harris M.B., Turner A.S.: Bioresorbable polylactide interbody implants in an ovine anterior cervical discectomy and fusion model: three-year results. Spine 33 (2008) 734-742.

[3] Bostman O., Pihlajamaki H.: Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. Biomaterials 21 (2000) 2615-2621.

[4] Aunoble S., Clement D., Frayssinet P., Harmand M.F., Le Huec J.C.: Biological performance of a new beta-TCP/PLLA composite material for applications in spine surgery: in vitro and in vivo studies. J Biomed Mat Res. Part A 78 (2006) 416-422.

[5] Bernstein A., Tecklenburg K., Sudkamp P., Mayr H.O.: Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. Arch Orthop Trauma Surg 132 (2012) 1637-1645.

[6] Kikuchi M., Koyama Y., Takakuda K., Miyairi H., Shirahama N., Tanaka J.: In vitro change in mechanical strength of beta-tricalcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide composites and their application for guided bone regeneration. J Biomed Mat Res 62 (2002) 265-272.

[7] Zhu N., Cui F.Z., Hu K., Zhu L.: Biomedical modification of poly (L-lactide) by blending with lecithin. J Biomed Mat Res. Part A 82 (2007) 455-461.

Conclusions

In this work, we demonstrate that although lecithin addition improved hydrophilicity of the PLLA-based composite, it does not improve adhesion and proliferation of cells. Such statement is supported by Live/Dead staining and viability/ proliferation test.

Acknowledgements

This work was supported by National Centre for Research and Development grant NR13-0008-10/2010. The authors have no conflict of interest.

[8] Kudelska-Mazur D., Lewandowska-Szumiel M., Mazur M., Komender J.: Osteogenic cell contact with biomaterials influences phenotype expression. Cell and Tissue Banking 6 (2005) 55-64.
[9] Schreer A., Tinson C., Sherry J.P., Schirmer K.: Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. Analytical Biochemistry 344 (2005) 76-85.

[10] Liu Y.S., Huang Q.L., Kienzle A., Muller W.E.G., Feng Q.L.: In vitro degradation of porous PLLA/pearl powder composite scaffolds. Mat Sci Eng C-Mater 38 (2014) 227-234.

[11] Imai Y., Fukuzawa A., Watanabe M.: Effect of blending tricalcium phosphate on hydrolytic degradation of a block polyester containing poly(L-lactic acid) segment. J Biomater Sci Polym Ed 10 (1999) 773-786.

[12] Cao L., Duan P.G., Wang H.R., Li X.L., Yuan F.L., Fan Z.Y., Li S.M., Dong J.: Degradation and osteogenic potential of a novel poly(lactic acid)/nano-sized beta-tricalcium phosphate scaffold. Int J Nanomedicine 7 (2012) 5881-5888.

[13] Engineer C., Parikh J., Raval A.: Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System. Trends Biomater. Artif Organs 25 (2011) 79-85. [14] Xu Z., Wu Q.: Effect of lecithin content blend with poly(L-lactic acid) on viability and proliferation of mesenchymal stem cells. Mater Sci Eng C 29 (2009) 1593-1598.

[15] Marathe G.K., Harrison K.A., Murphy R.C., Prescott S.M., Zimmerman G.A., McIntyre T.M.: Bioactive phospholipid oxidation products. Free Radic Biol Med 28 (2000) 1762-1770.

[16] Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L.: Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science 310 (2005) 1139-1143.

•••••

WPŁYW DOMIESZKI WĘGLA SZKLISTEGO DO CEMENTU CHIRURGICZNEGO NA JEGO TRWAŁOŚĆ I ADAPTACJE **W ORGANIZMIE**

ALICJA BALIN*

POLITECHNIKA ŚLASKA. WYDZIAŁ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, KATEDRA BIOMECHATRONIKI. UL. F. ROOSEVELTA 40, 41-800 ZABRZE *E-MAIL: ALICJA.BALIN@POLSL.PL

Streszczenie

Praca koncentruje się na zagadnieniu modyfikacji cementu chirurgicznego na bazie PMMA cząstkami węgla szklistego w postaci proszku o granulacji 40-160 µm i udziale masowym od 1,6% do 3,1%, pierwotnie w celu obniżenia temperatury polimeryzacji, a następnie w celu zwiększenia trwałości cementu w środowisku organizmu i poprawy właściwości biologicznych granicy międzyfazowej cement-kość. Przeprowadzono badania procesu polimeryzacji cementu niemodyfikowanego oraz modyfikowanego węglem szklistym. Symulując obciążenia cementu podczas ruchu człowieka, a także oddziaływanie środowiska organizmu, przeprowadzono badania zmęczeniowe niskocyklowe próbek z cementu niemodyfikowanego i modyfikowanego w stanie wyjściowym, po moczeniu w roztworze Ringera i po naświetlaniu promieniami RTG w warunkach takich, jak w czasie prześwietlania pacjentów. Cement modyfikowany węglem szklistym implantowano do kości udowych zwierząt doświadczalnych (królików).

W warunkach obciążenia zmęczeniowego niskocyklowego cement na osnowie PMMA modyfikowany domieszka wegla szklistego wykazywał mniejsza prędkość cyklicznego pełzania w porównaniu do cementu bez domieszki. Cement modyfikowany węglem szklistym po starzeniu w środowisku roztworu Ringera oraz po naświetlaniu promieniami RTG zachował w większym stopniu swe właściwości lepkosprężyste, niż cement bez domieszki. Wynika z tego, że domieszka węgla szklistego ograniczyła postęp procesu starzenia cementu chirurgicznego. Wyniki badań mikroskopowych preparatów histologicznych pobranych z doświadczalnych królików, którym zaimplantowano zmodyfikowany węglem cement nie wykazały cech świadczących o zwiększonym nasileniu procesów patologicznych. Wykazano, że modyfikacja fizyczna cementu chirurgicznego poprzez zastosowanie domieszki węgla szklistego może obniżyć maksymalną temperaturę układu polimeryzującego.

Słowa kluczowe: cement chirurgiczny, węgiel szklisty, niskocyklowe zmęczenie, temperatura polimeryzacji

[Inżynieria Biomateriałów 131 (2015) 12-31]

THE EFFECT OF A GLASSY **CARBON ADDITIVE TO SURGICAL** CEMENT ON ITS DURABILITY AND ADAPTATION IN THE ORGANISM

ALICJA BALIN*

SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF BIOMEDICAL ENGINEERING, **BIOMECHATRONICS DEPARTMENT**, UL. F. ROOSEVELTA 40, 41-800 ZABRZE, POLAND *E-MAIL: ALICJA.BALIN@POLSL.PL

Abstract

This paper focuses on the issue of modification of PMMA-based surgical cement with glassy carbon in the form of powder with 40-160 µm granulation, in the amount of 1.6-3.1 w/w %, originally in order to lower the polymerization temperature, and then to increase the durability of cement in the organism environment and to improve biological properties of the cement-bone interphase boundary. Examinations were conducted of the polymerization of both unmodified and modified cement. Simulating a load of cement when the human gait, as well as the impact of the environment of the body, low cycle fatigue tests were carried, using the unmodified and modified cement samples in the initial state, aged in Ringer's solution and after irradiation with X-RAY. Cement doped with glassy carbon was implanted into femoral bone of experimental animals (rabbits).

Under low-cycle fatigue conditions the PMMA-based cement modified with a glassy carbon additive showed a lower cyclic creep rate compared to cement with no additive. After ageing in Ringer's solution and X-rav exposure the cement modified with glassy carbon retained its viscoelastic properties to a larger degree than the cement with no additive. Therefore, the glassy carbon additive limited the progress of the ageing process of surgical cement. The results of microscopic examinations of histological specimens extracted from laboratory rabbits implanted with cement modified with glassy carbon did not reveal any properties which would indicate increased intensity of pathological processes. A physical modification of bone cement by using a glassy carbon additive caused a decrease in the maximum temperature of polymerizing system.

Keywords: surgical cement; glassy carbon; low cycle fatigue; polymerization temperature

[Engineering of Biomaterials 131 (2015) 12-31]

Wprowadzenie

Analiza wyników badań laboratoryjnych i klinicznych w obszarze dotyczącym biomateriałów stosowanych w ortopedii pozwala stwierdzić, że cement kostny, będący kompozytem polimerowym, jest nadal podstawowym materiałem używanym do mocowania endoprotez stawów, szczególnie w przypadku pacjentów w podeszłym wieku. Producentami cementów kostnych są różne firmy, m.in. w Wielkiej Brytanii, Szwajcarii, Niemczech i USA [1,2]. Wytwarzanych jest wiele gatunków cementów, z których większość stanowią samopolimeryzujące masy akrylowe, formowane w czasie operacji z mieszaniny sproszkowanego polimeru i płynnego monomeru. Składnikiem polimerowym jest zazwyczaj polimetakrylan metylu (PMMA). Ciekłym składnikiem monomerowym jest najczęściej metakrylan metylu (MMA), a niekiedy jego mieszanina z innymi monomerami akrylowymi. Cement kostny, jako kompozyt polimerowy, zawiera w swoim składzie chemicznym dodatki spełniające określone funkcje w procesie polimeryzacji lub modyfikujące jego właściwości. Skład chemiczny cementów, rodzaj materiałów wyjściowych, sposób formowania i przebieg polimeryzacji, która zachodzi w łożu kostnym, decydują o ich właściwościach [1-8].

Cementom akrylowym stosowanym w ortopedii stawiane są wymagania takie, jak: sprężystość zbieżna ze sprężystością kości, wysoka wytrzymałość zmęczeniowa i odporność na pękanie, zdolność do tłumienia drgań, odporność na ścieranie, biotolerancja, które zapewnią spełnienie odpowiednich wymogów biofunkcjonalności implantu w organizmie człowieka. Stosowane w chirurgii kostnej cementy wymagań tych nie spełniają w dostatecznym stopniu. Obserwowaną patologiczną ruchomość wcementowanych w jame szpikowa trzpieni endoprotez wyjaśnia się niska wytrzymałością zmęczeniową cementu, jego małą odpornością na pękanie, dużą kruchością [9]. Na stykach układu: trzpień endoprotezy-cement-kość występują mikroruchy, w wyniku których powstają cząstki mikrowykruszonego cementu [10]. Tworzące się okruchy cementu mogą powodować osteolizę kości, a także zużycie panewek polietylenowych. Jeżeli powstałe na skutek wykruszania się lub erozji cząstki cementu znajdą się pomiędzy powierzchniami ciernymi stawu, to może nastąpić jego drastyczne zużycie [10,11]. Cementy kostne wciąż jeszcze charakteryzują się niedostateczną zgodnością biologiczną, skłonnością do degradacji, a także wysoką temperaturą utwardzania, pod wpływem której następuje uszkodzenie termiczne tkanek. Polimeryzacja cementu zachodzi z kontrakcja objetości wynikającą z różnicy gęstości polimeru i monomeru. Wysoka temperatura utwardzania powoduje także tworzenie w masie pęcherzyków par monomeru oraz powiększenie objętości pęcherzyków powietrza uwięzionych w tej masie w trakcie mieszania składników. Czynniki te są przyczyną skurczu polimeryzacyjnego materiału (1-5%) oraz jego porowatości (1-10%). Skutkiem tego może być powstawanie obluzowań pomiędzy cementem i kością, zatem znaczne skrócenie okresu użytkowania protezy [3-12].

Kierunki poprawy właściwości użytkowych cementów chirurgicznych sprowadzają się do zmiany ich właściwości fizykochemicznych i mechanicznych poprzez ich fizyczną i chemiczną modyfikację [6-8,12-16]. W celu poprawy biotolerancji opracowywane są cementy ze zmniejszonym, niż w standardowych, udziałem procentowym monomeru metakrylanu metylu (MMA). Podejmowane są również próby jego zamiany na polimetakrylan etylu. Na przykład, tą drogą uzyskano niższą temperaturę wiązania nowego cementu Boneloc w porównaniu do temperatury wiązania cementu Palacos, ale kosztem obniżonych właściwości wytrzymałościowych [13].

Introduction

Based on an analysis of the results of laboratory and clinical studies in the area of biomaterials used in orthopaedics it can be stated that bone cement, which is a polymeric composite, remains the main material used to fix joint endoprostheses, especially in elderly patients. Bone cement is produced by various companies, among others from the United Kingdom, Switzerland, Germany and USA [1,2]. Numerous cement grades are produced, most of which are self-polymerizing acrylic masses formed during a surgery from a mixture of a powdered polymer and liquid monomer. The polymer ingredient is usually polymethyl methacrylate (PMMA). The liquid monomer constituent is usually methyl methacrylate (MMA) and sometimes its mixture with other acrylic monomers. Bone cement, as a polymer composite, contains in its chemical composition additives which perform specific functions in the polymerization process or which modify its properties. The properties of cements are determined by their chemical composition, types of base materials, the method of forming and the course of polymerization which takes place in the osseous bed [1-8].

Requirements to be met by acrylic cements applied in orthopaedics include: elasticity similar to bone elasticity, high fatigue strength, resistance to cracking, vibration damping capacity, abrasive resistance and biotolerance; they should ensure compliance with appropriate biofunctionality requirements set to an implant in the human organism. Cements applied in bone surgery do not meet these requirements to a sufficient degree. The observed pathological mobility of endoprosthesis stems cemented into the marrow cavity is explained by low fatigue strength of the cement, its low cracking resistance and high brittleness [9]. At the point of contact of the endoprosthesis stem - cement - bone system micromovements occur which lead to the formation of micro-spall cement particles [10], which in turn may cause bone osteolysis and wear of polyethylene acetabular cups. If cement particles formed due to spalling or erosion get between friction surfaces of a joint, its severe wear may occur [10,11]. Bone cements still feature insufficient biological compatibility, susceptibility to degradation and high curing temperature which causes thermal damage to tissues. Cement polymerization occurs along with volume contraction resulting from the difference between the density of the polymer and the monomer. High curing temperature also causes the formation of monomer vapours in the vesicle mass and an increase in the volume of the air vesicles trapped in that mass during the mixing of ingredients. These factors cause polymerization shrinkage of the material (1-5%) and its porosity (1-10%), which may lead to loosening the contact between the cement and the bone, thereby significantly shortening the life cycle of the prosthesis [3-12].

The directions of improvement of the functional properties of surgical cements come down to changes in their physicochemical and mechanical properties through a chemical and physical modification [6-8,12-16]. In order to improve biotolerance, cements are being developed with a decreased percentage fraction of the methyl methacrylate (MMA) monomer compared to standard ones. Attempts are also being made to replace it with poly(ethyl methacrylate). For example, a lower setting temperature of the new Boneloc cement, compared to the setting temperature of the Palacos cement, was obtained in this way, however at the expense of lower strength properties [13].

Na świecie i w kraju prowadzone są badania nad opracowaniem nowego cementu, nie będącego kompozytem polimerowym, jak np. cement fosforanowy [14], czy wapniowo-fosforanowy [15]. Cementy takie, ze względu na niskie właściwości wytrzymałościowe, mogą być jednak stosowane tylko do wzmocnienia kotwiczenia implantów lub uzupełniania ubytków kostnych. Najczęściej jednak podejmowane są próby poprawy właściwości wytrzymałościowych cementu akrylowego poprzez wprowadzanie do niego domieszek, takich jak: włókna węglowe, poliuretanowe, polietylenowe i aramidowe, stalowe i tytanowe lub proszek apatytowy i tworzywo szklano-ceramiczne (witroceram) [6,7,11,16,17]. Dodatek włókien węglowych do składu podstawowego cementu (PMMA) powodował przedłużenie czasu polimeryzacji do prawie godziny i dlatego cement taki nie znalazł zastosowania klinicznego [17].

W świetle prezentowanych w literaturze dotychczasowych osiągnięć należy stwierdzić, że wybór kierunków poprawy właściwości użytkowych kompozytów na bazie PMMA, stosowanych w charakterze cementu w chirurgii kostnej, nadal pozostaje problemem otwartym na różne rozwiązania. Biomateriałami o perspektywicznym znaczeniu dla chirurgii są materiały węglowe. Świadczy o tym duża liczba publikacji odzwierciedlających kierunki prowadzonych badań poznawczych oraz obserwacji klinicznych tej grupy biomateriałów. Jak podaje literatura [3], dotychczasowe osiągnięcia inżynierii biomedycznej z zakresu zastosowania implantacyjnych materiałów węglowych w chirurgii rekonstrukcyjnej są pozytywne. Aktualne możliwości technologiczne pozwalają na modyfikowanie struktury materiałów weglowych, począwszy od krystalicznej (grafit) poprzez przejściowe (węgiel turbostratyczny) do struktury bezpostaciowej (węgiel szklisty) [3,4].

Węgiel szklisty jest otrzymywany z materiału organicznego na drodze pirolizy i karbonizacji do 1200°C (1473 K). Prekursorem może być żywica, pak, usieciowane polimery. Wegiel szklisty charakteryzuje się szklistym przełomem i daje się łatwo polerować. Przewodzi ciepło i prąd elektryczny, jest odporny na wysokie temperatury. Mimo, że jego budowa strukturalna różni się od typowej struktury substancji bezpostaciowych, szklistych, jednak niektóre jego cechy, takie jak kruchość czy brak porowatości otwartej, występowanie mikroporów zamkniętych, nieprzepuszczalność dla gazów są podobne jak dla substancji szklistych [4,18]. Węgiel szklisty charakteryzuje się doskonałą biozgodnością. Porowata postać węgla szklistego pełni funkcję konstrukcji dla wrastania kości. Jego mechaniczne właściwości są odpowiednie dla pełnienia funkcji strukturalnego substytutu kości w obszarach, w których oddziałuja naprężenia ściskające. Przeprowadzone w pracach [19,20] badania wrastania kości w pory implantu z wegla szklistego w organizmie doświadczalnych królików ujawniły już po 3 tygodniach nowo utworzoną kość w porach. Po 12 tygodniach ilość tkanki kostnej osiągnęła maksimum, kiedy to 45% objętości całkowitej porów zawierało w sobie tkankę kostną. Wrastanie kości do implantu węglowego wzrasta z czasem i jest najbardziej intensywne w obszarach kontaktu implantu z kością korową lub beleczkami kości gąbczastej. Jednocześnie zwiększa się gęstość kości. Niepomyślnych reakcji tkankowych nie zaobserwowano [19,20].

Biorąc pod uwagę wszystkie cechy węgla szklistego, korzystne dla organizmu i mechanizmu przenoszenia obciążeń z implantu do kości [21], w pracach [22,25-30] podjęto próbę zastosowania tego materiału do modyfikacji cementu chirurgicznego na bazie PMMA. Research is conducted all around the world, including Poland, to develop a new type of cement which would not be a polymer composite, e.g. phosphate cement [14] or calcium-phosphate cement [15]. However, because of their low strength properties, such cements can be used only for strengthening the anchoring of implants or for filling bone defects. Yet, the most frequent attempts to improve the strength properties of acrylic cement involve the introduction of additives, such as: carbon, polyurethane, polyethylene, aramid, steel and titanium fibres or apatite powder and a glass-ceramic (vitroceramic) material [6,7,11,16,17]. A carbon fibre additive to the basic composition of cement (PMMA) caused the lengthening of the polymerization time to almost an hour and for this reason such cement has not found any clinical application [17].

In view of previous achievements presented in the literature, it should be noted that the selection of the directions of improvement of functional properties of PMMA-based composites used as cement in bone surgery is still a problem which is open to different solutions. At the same time, carbon biomaterials hold real promise for surgery. This is evidenced by a large number of publications which reflect the directions of cognitive research and clinical observations of this type of biomaterials. According to the literature [3], previous biomedical engineering achievements in the field of application of implantable carbon materials in reconstructive surgery are positive. The state-of-the-art technology enables modifying the structure of carbon materials, beginning from a crystalline structure (graphite), through a transitory structure (turbostratic carbon), and ending with an amorphous structure (glassy carbon) [3,4].

Glassy carbon is obtained from an organic material through pyrolysis and carbonization to 1200°C (1473 K). Resin, pitch or cross-linked polymers can be the precursors here. Glassy carbon is characterized by a vitreous fracture and is easy to polish. It conducts heat and electricity and is resistant to high temperatures. Although its structure is different than the typical structure of amorphous and vitreous substances, some of its properties, such as brittleness or the lack of open porosity, the presence of closed micropores and gas impermeability, are similar to those of vitreous substances [4,18]. Glassy carbon is characterized by excellent biocompliance. A porous form of glassy carbon functions as a frame for bones to grow into. Its mechanical properties are appropriate for glassy carbon to act as a structural substitute of the bone in regions where compressive stresses occur. The studies focused on bone growing into pores of a glassy carbon implant in laboratory rabbits, described in papers [19,20], revealed a newly formed bone in the pores as early as 3 weeks later. After 12 weeks the amount of the bone tissue reached a maximum: 45% of the total volume of pores contained osseous tissue. The growing of bone into a carbon implant increases over time and it is at its most intense in the areas of contact with the cortical bone or trabeculae of the spongy bone. Simultaneously, the density of the bone increases. No unfavourable tissue reactions were observed [19,20].

Taking into account all characteristics of glassy carbon, advantageous to both the organism and the mechanism of load transmission from an implant to the bone [21], an attempt was undertaken in papers [22,25-30] to use this material for the modification of PMMA-based surgical cement.

Głównym problemem związanym z konstrukcją endoprotezy jest mechanizm przenoszenia obciążenia w połączeniu stawowym. Po implantacji endoprotezy ulega zmianie przestrzenny układ obciążeń. W związku z tym odmienny od naturalnego jest rozkład naprężeń w kości udowej oraz miednicy. Przyczyną powstawania niekorzystnego dla kości rozkładu naprężeń w komponentach sztucznego stawu, w przypadku cementowej endoprotezoplastyki, są właściwości metalu i cementu kostnego. Metal, z którego wykonuje się m.in. trzpienie endoprotez do kotwiczenia przy użyciu cementu, nie dopasowuje się do biologiczno-sprężystych właściwości kości, gdyż charakteryzuje się zbyt wysokim modułem sprężystości. Duże znaczenie przy przenoszeniu obciążeń z trzpienia endoprotezy do kości mają właściwości sprężyste cementu. Moduł Younga cementu kostnego jest kilkakrotnie niższy niż moduł kości korowej. Cement kostny jest zatem najsłabszym ogniwem w układzie biomechanicznym: endoproteza-cement-kość. Po utwardzeniu cement kostny z polimetakrylanu metylu jest twardym, kruchym materiałem, skłonnym do pękania pod wpływem oddziaływania naprężeń rozciągających, co ma miejsce szczególnie w proksymalnym obszarze układu kość-proteza [7,8,21,24].

Na trwałość sztucznego stawu biodrowego, zwłaszcza w przypadku cementowego kotwiczenia komponentów endoprotezy, mają znaczny wpływ procesy reologiczne, a szczególnie pełzanie i relaksacja. Cement chirurgiczny, jako kompozycja polimerowa, w modelowym ujęciu jest klasycznym przykładem ciała lepkosprężystego. Również kość można traktować jako materiał lepkosprężysty. Właściwości fizykochemiczne i mechaniczne takich materiałów zmieniają się w czasie. W związku z właściwościami reologicznymi więzów z materiałów kotwiczących endoprotezę w kanale kości udowej zagadnienie oceny trwałości sztucznego stawu biodrowego jest złożone. Należy również zaznaczyć, że rozpiętość skali różnic i zasięgu występowania zjawisk niszczenia połączenia biomechanicznego w porównaniu ze zjawiskami dekohezji w materiałach technicznych iest tak znaczna, iż adaptacia do tei oceny metod badań z obszaru mechaniki materiałów obliguje do szczególnie wnikliwej analizy i interpretacji ich wyników.

Spośród wielu cech cementu chirurgicznego, wpływających na trwałość cementowej endoprotezoplastyki, najbardziej istotne dla klinicznej weryfikacji protezy są te cechy, które uzależnione sa wprost od oddziaływania cyklicznych obciążeń zarówno w krótkim, jak i długim okresie. W ciągu doby u typowego pacjenta ze sztucznym stawem biodrowym występują bowiem okresy aktywności ruchowej oraz okresy odpoczynku. Wiążą się one odpowiednio ze zmieniającymi się charakterystykami obciążenia stawu, a w nim cementu jako jednego z jego komponentów. Zjawisko niszczenia cementu podczas ruchu człowieka odbywa się pod działaniem cyklicznych zmian obciażeń o dużych wartościach, a więc można je z dużym prawdopodobieństwem określić jako zmęczenie w zakresie małej liczby cykli. Mając to na względzie, do oceny zachowania się cementu w sztucznym stawie biodrowym, zastosowano metodę badań zmęczenia niskocyklowego [7,8,11,16,22,25-30]. Cement akrylowy, stosowany do kotwiczenia endoprotez całkowitych biodra, pełza w warunkach dynamicznego i statycznego obciążenia. W wyniku tego następuje osiadanie trzpienia endoprotezy oraz zmniejszenie składowych naprężenia w cemencie. To osiadanie protezy jest uzależnione również od tarcia na granicy międzyfazowej, a więc w dużym stopniu od chropowatości protezy i struktury cementu [23,24].

Niniejsza praca koncentruje się na zagadnieniu modyfikacji cementu chirurgicznego na bazie PMMA cząstkami węgla szklistego, pierwotnie w celu obniżenia temperatury polimeryzacji, a następnie w celu zwiększenia trwałości cementu w środowisku organizmu i poprawy właściwości biologicznych granicy międzyfazowej cement-kość.

The main problem connected with the structure of the endoprosthesis is the load transmission mechanism in a joint. After implantation of an endoprosthesis the spatial distribution of load changes. Because of this, the distribution of stresses in the femoral bone and pelvis is different than the natural one. In the case of endoprosthesoplasty which uses cement, the reason for the occurrence of stress distribution in the components of an artificial joint, adverse to the bone, is caused by the properties of the bone cement and metal. The metal used, among others, for the production of endoprosthesis stems to be anchored by means of cement does not match the biological and elastic properties of bones because it is characterized by too high elasticity modulus. Elastic properties of cement play an important role in load transmission from the endoprosthesis stem to the bone. Young's modulus for bone cement is a few times lower than that of the cortical bone. Therefore, bone cement is the weakest link in the endoprosthesis-cement-bone biomechanical system. After curing bone cement made of polymethyl methacrylate is a hard and brittle material, susceptible to cracking under tensile stresses, which occur mainly in the proximal area of the bone-prosthesis system [7,8,21,24].

Durability of the artificial hip joint, especially in the case of cement anchoring of endoprosthesis components, depends to a large extent on rheological processes, in particular creep and relaxation. Surgical cement, being a polymer composition, in a model approach represents a classic example of a viscoelastic body. The bone can be also be considered a viscoelastic material. The physicochemical and mechanical properties of such materials change over time. In connection with the rheological properties of bonds made of materials which anchor the endoprosthesis in the femoral bone channel, the problem of the artificial hip joint's durability evaluation is complex. It should also be emphasized that the spread of the scale of differences and the occurrence range of the destruction phenomena of the biomechanical bonding, when compared to decohesion phenomena in technical materials, is so large that the adaptation of methods applicable in the field of material mechanics to such evaluation obliges the researchers to conduct a particularly thorough analysis and interpretation of their results.

Among many properties of surgical cement which influence the durability of endoprosthesoplasty, the most important ones for clinical verification of the prosthesis are those which directly depend on the cyclic load imposed, both in a short- and a long-term period. This is because in a 24-hour period, there are periods of both physical activity and rest in a typical patient with an artificial hip joint. They are connected with variable characteristics of load imposed on a joint and cement inside it, the latter being one of the components of the joint. The phenomenon of cement degradation during a person's movement takes place under the action of cyclic changes of high loads. Therefore, they can be defined with high probability as fatigue in the range of a small number of cycles. Bearing this in mind, cement behaviour in an artificial hip joint was evaluated by applying the low-cycle fatigue testing method [7,8,11,16,22,25-30]. Acrylic cement used for anchoring complete hip endoprostheses creeps under dynamic and static load conditions. As a result the endoprosthesis stem settles and constituents of stress in cement decrease. This setting of a prosthesis also depends on friction at an interphase boundary and thus, to a large degree, on the prosthesis porosity and cement structure [23,24].

This paper focuses on the issue of modification of PMMA-based surgical cement with glassy carbon particles, originally in order to lower the polymerization temperature, and then to increase the durability of cement in the organism environment and to improve biological properties of the cement-bone interphase boundary.

¹⁶ Materiały badawcze

Badania prowadzono na cementach kostnych o nazwach fabrycznych Palacos R, Palamed, a następnie Biomet Plus, przeznaczonych do kotwiczenia endoprotez stawów w kości. Składy chemiczne tych cementów nie różniły się zasadniczo – zawierały komponenty przedstawione w TABELI 1.

TABLE 1. Skład chemiczny cementu stosowanego do badań.

TABLE 1. The chemical composition of the cement used for research.

Research materials

The research was conducted on bone cements with the manufacturers' names Palacos R and Palamed and then on Biomet Plus, intended for anchoring joint endoprostheses into bones. The chemical composition of these cements did not differ significantly. They contained components listed in TABLE 1.

Nazwa cementu Producent		Skład chemiczny The chemical composition	
Cement name	Manufacturer	Proszek Powder	Płyn Liquid
Biomet Plus	Biomet Orthopaedics Switzerland GmbH	poly(methyl methacrylate) - 38.3 g zirconium dioxide - 5.3 g benzoyl peroxide - 0.4 g	methyl methacrylate - 18.4 g N,N-dimethyl-p-toluidine - 0.4 g chlorophyllin VIII, hydroquinone

Cement domieszkowano węglem szklistym w postaci proszku o granulacji 40-160 µm. Węgiel szklisty otrzymano metodą karbonizacji żywicy fenolowo-formaldehydowej F-110 w temperaturze 1100°C (1373 K), przy zachowaniu ściśle określonych warunków przyrostu temperatury. W celu uzyskania węgla szklistego użyto żywicy w postaci rozkawałkowanej. Po procesie karbonizacji kawałki te podlegały mieleniu w młynie udarowo-nożowym do postaci proszkowej (RYS. 1). Wielkość cząstek węgla szklistego dobrano tak, aby była ona porównywalna z wielkością ziarna proszku polimerowego cementu kostnego (RYS. 1 i 2).

Glassy carbon in the form of powder with 40-160 µm granulation was added to cement. Glassy carbon was obtained via carbonization of the F-110 phenol-formaldehyde resin at a temperature of 1100°C (1373 K) while maintaining strictly defined temperature growth conditions. The glassy carbon was obtained from resin which had been divided into pieces. After carbonisation these pieces were ground to powder in an impact-blade mill (FIG. 1). The size of glass carbon particles was selected so that it was comparable to the size of the grain of the bone cement polymer powder (FIGs. 1 and 2).



RYS. 1. Zdjęcia węgla szklistego w postaci proszku przy powiększeniu 100x i 1000x [25,26].

FIG. 1. Scanning electron microscopy photographs of the glassy carbon powder with magnification 100x and 1000x [25,26].





RYS. 2. Zdjęcia proszku polimerowego PMMA cementu kostnego przy powiększeniu 100x i 1000x: cząstka proszku PMMA (1), cząstka dwutlenku cyrkonu (2) [25,26].

FIG. 2. Scanning electron microscopy photographs of polymethacrylate bone cements with magnification 100x and 1000x: polymer bead (1), zirconium dioxide (2) [25,26]. Z cementów kostnych niemodyfikowanych oraz modyfikowanych węglem szklistym przygotowano próbki do badań mechanicznych. Proszek węgla szklistego mieszano najpierw z proszkiem polimerowym cementu, a następnie proszek z płynem monomerowym. Węgiel szklisty stosowano do modyfikacji cementu po uprzednim wysuszeniu go w temperaturze 70°C (343 K) przez okres 24 godzin.

Cement kostny modyfikowano węglem szklistym w ilości 1 g oraz 2 g na opakowanie 40 g proszku, co odpowiada 1,6% mas. oraz 3,1% mas.

Aby sprawdzić, w jaki sposób oddziałuje środowisko organizmu oraz kontrolne prześwietlania (RTG) pacjentów na charakterystyki mechaniczne, przeprowadzono dodatkowo badania na próbkach, które poddawane były następującym procesom:

- Starzeniu w roztworze Ringera o temperaturze organizmu (37°C) przez okres 10 tygodni;
- 2. Naświetlaniu promieniami rentgenowskimi w warunkach odpowiadających prześwietlaniu pacjentów po protezoplastyce całkowitej biodra. Próbki poddawano jednocześnie ekspozycji na promieniowanie RTG 5-krotnie w odstępach 1-dniowych (łącznie 20 ekspozycji na każdą próbkę) z odległości 1 m. Zastosowano dawki: 10 razy 75 kV / 25 mAs oraz 10 razy 77 kV / 32 mAs. Pomiędzy naświetlanymi próbkami a lampą RTG umieszczona była warstwa wody o grubości 3 cm w woreczku foliowym, imitująca pochłanianie promieni RTG przez tkanki człowieka.

Uzyskane wyniki badań miały stanowić podstawę do oceny trwałości w środowisku organizmu polimerowych cementów z uwzględnieniem ich modyfikacji węglem szklistym oraz do oceny możliwości zastosowania modyfikowanych cementów w ortopedii.

Metodyka i wyniki badań

Badania procesu polimeryzacji cementów kostnych niemodyfikowanych i modyfikowanych

Wyniki obliczeń teoretycznych zmiennych w czasie rozkładów temperatury w warunkach procesu polimeryzacji oraz wyniki wcześniejszych eksperymentalnych badań zrealizowanych na modelach laboratoryjnych sztucznego stawu biodrowego pozwalają wnioskować, że poprzez modyfikację cementu węglem szklistym jest możliwe obniżenie maksymalnej temperatury układu polimeryzującego, jak i zmniejszenie skurczu [7,11,16]. Dodatek węgla szklistego w postaci proszku do cementu na bazie PMMA zwiększa współczynnik przewodnictwa cieplnego utworzonego kompozytu. Współczynnik ten dla węgla szklistego mieści się w przedziale 188-220 W/mK, podczas gdy jego wartość dla PMMA jest równa 0,19 W/mK. Cząstki węgla szklistego odbierają część ciepła podczas polimeryzacji MMA. Domieszka takiego materiału może ponadto hamować kurczenie się masy cementu w procesie polimeryzacji. Współczynnik liniowej rozszerzalności cieplnej dla węgla szklistego wynosi bowiem (1,5-3,0)x10⁻⁶ K⁻¹ i jest mniejszy niż dla PMMA, dla którego wynosi 60x10⁻⁶ K⁻¹ [31,32].

Przeprowadzono badania procesu polimeryzacji cementu kostnego w stanie niemodyfikowanym i po modyfikacji węglem szklistym w ilości 1,6% mas. Badania realizowano dwiema metodami. Pierwsza metoda polegała na pomiarze temperatury polimeryzacji w zależności od czasu w warunkach objętych normą ISO 5833 [33]. Polimeryzujący cement znajdował się w zamkniętej formie wykonanej z wysokocząsteczkowego polietylenu (UHMWPE) o wewnętrznych wymiarach: średnicy 60 mm i wysokości 6 mm. Temperaturę polimeryzacji mierzono za pomocą termopary typu K (NiCr–NiAI). Samples for mechanical tests were prepared from nonmodified cements and from those modified with glassy carbon. Glassy carbon powder was mixed first with the cement polymer powder and then the powder was mixed with the monomer fluid. Glassy carbon was used to modify cement which had been dried at a temperature of 70°C (343 K) for 24 hours.

Bone cement was modified with 1 g and 2 g of glassy carbon per a 40 g package of powder, which corresponds to 1.6% w/w, and 3.1% w/w.

In order to check how the environment of the organism and patients' check-up X-rays affect mechanical characteristics, additional tests were performed on specimens which underwent the following processes:

- 1. Ageing in Ringer's solution at human body temperature (37°C) for a period of 10 weeks.
- Exposure to X-rays in conditions corresponding to patients' X-rays after total hip arthroplasty. Samples were also exposed to X-ray radiation five times, at 1-day intervals (a total of 20 exposures for each specimen) from a distance of 1 m. The following doses were applied: 10 times 75 kV / 25 mAs and 10 times 77 kV / 32 mAs. Between the exposed specimens and an X-ray tube there was a 3 cm layer of water in a plastic bag which imitated the absorption of X-rays by human tissues.

The obtained test results were to be the basis for the evaluation of durability of polymer cements in the organism, taking into account their modification with glassy carbon, and for the assessment of the possibility of applying modified cements in orthopaedics.

Research methodology and results

Examination of the polymerization process of modified and non-modified bone cements

The results of theoretical calculations of temperature distributions variable over time in the polymerization process conditions and the results of earlier experimental examinations of laboratory models of an artificial hip joint lead to a conclusion that it is possible to reduce shrinkage and the maximum temperature of a polymerizable system by modifying cement with glassy carbon [7,11,16]. A powdered glassy carbon addition to a PMMA-based cement enhances the thermal conductivity coefficient of the composite produced. This coefficient ranges from 188 to 220 W/mK for glassy carbon, while its value for PMMA is 0.19 W/mK. Glassy carbon particles receive some heat during MMA polymerization. An addition of such material can also hinder the shrinkage of the cement bulk in the polymerization process. This is because the linear thermal expansion coefficient for glassy carbon is (1.5-3.0)x10⁻⁶ K⁻¹, which is lower than for PMMA (60x10⁻⁶ K⁻¹) [31,32].

Examinations were conducted of the polymerization of both unmodified cement and cement which had been modified with glassy carbon in the amount of 1.6 w/w %. The examinations were carried out using two methods. The first method consisted in the measurement of the polymerization temperature as a function of time under conditions included in the ISO 5833 standard [33]. Polymerizable cement was placed in a closed mould made of high-molecular-weight polyethylene (UHMWPE) with the following internal dimensions: 60 mm diameter and a height of 6 mm. The polymerization temperature was measured with a K type thermocouple (NiCr – NiAl). Termoparę o średnicy 0,5 mm wprowadzano przez otwór znajdujący się w dnie formy do wnętrza formy na wysokość 3 mm. Badania temperatury polimeryzacji w formie przeprowadzono w temperaturze pokojowej 23°C (293 K). Aby zamodelować wpływ środowiska organizmu na proces polimeryzacji cementu przeprowadzono także badania polimeryzacji tych samych cementów w probówkach zanurzonych w wodzie podgrzanej do temperatury 37°C (310 K). Probówki miały średnicę 10 mm, termoparę umieszczano w środku masy cementowej. Kształt i objętość masy cementowej w probówce była zbliżona do masy cementu poniżej końca trzpienia endoprotezy w kości udowej.

Do rejestracji wyników zastosowano komputer z oprogramowaniem Catman 3.1 wraz ze wzmacniaczem pomiarowym. Wyznaczono zależność temperatury polimeryzacji od czasu [25,26].

W celu przeprowadzenia badań procesu polimeryzacji cementu chirurgicznego w warunkach symulujących warunki jego implantacji do organizmu, zbudowano model laboratoryjny sztucznego stawu biodrowego z oryginalną endoprotezą. Model kości udowej z odpowiednim kanałem do wklejenia endoprotezy wykonano z żywicy poliestrowej ESTROMAL 14LM-01. Przy zapewnieniu wszystkich parametrów techniki kotwiczenia endoprotezy w kości, jak w czasie przeprowadzania operacji, do kanału modelu kości implantowano endoprotezę Wellera, przy zastosowaniu cementu chirurgicznego Palacos R.

W modelu kości nawiercano wcześniej wiertłem o średnicy 1 mm 3 otwory, w które wprowadzano termopary typu K (NiCr-NiAl) o średnicy drutu 0,25 mm. Termopary usytuowane były tak, że pozwalały rejestrować temperature polimeryzującego cementu na granicy styku z "kością" w okolicy górnej części trzpienia endoprotezy, środka trzpienia oraz na dole, poniżej końca trzpienia. Jako materiał modelujący kość zastosowano żywice, gdyż żywica charakteryzuje się właściwościami cieplnymi zbliżonymi do odpowiednich właściwości kości. Współczynnik przewodności cieplnej λ dla żywicy poliestrowej wynosi 0,2÷0,4 W/(m K) a λ kości waha się w granicach 0,26÷0,60 W/(m K). Ciepło właściwe żywicy poliestrowej wynoszące c = 1200÷2400 J/(kg K) jest porównywalne z ciepłem właściwym kości, dla której jest równe c = 1260÷2370 J/(kg K). Żywica posiada również gestość zbliżoną do gestości kości: gestość p żywicy waha się w granicach 1100÷1400 kg/m3, a gęstość p kości – w granicach 1000÷2900 kg/m3 [31,34,35]. Wykresy uzyskanych wartości temperatury polimeryzacji cementów w zależności od czasu przedstawiono na RYS. 3 i 4.



RYS. 3. Zmiana temperatury polimeryzacji w czasie dla cementu Palacos R [34,35]. FIG. 3. Change of polymerization temperature in

course of time for Palacos R cement [34,35].

A thermocouple with a 0.5 mm diameter was inserted into the mould to a height of 3 mm through an opening in its bottom. Polymerization temperature in the mould was examined at room temperature (23°C). In order to model the influence of the organism's environment on the cement polymerization of the same cements in test tubes submerged in water heated to a temperature of 37°C (310 K). The diameter of test tubes was 10 mm and a thermocouple was placed in the middle of the cement bulk. The shape and volume of the cement bulk in a test tube was similar to that of the cement bulk below the end of the endoprosthesis stem in the femoral bone.

A computer with the Catman 3.1 software and an instrumentation amplifier was used to record the results. The dependence of the polymerization temperature on time was determined [25,26].

A laboratory model of an artificial hip joint with an original endoprosthesis was built in order to examine the surgical cement polymerization in conditions simulating its implantation in an organism. A model of the femoral bone with a suitable channel for gluing in an endoprosthesis was made of the ESTROMAL 14LM-01 polyester resin. With all parameters of the technique of anchoring an endoprosthesis in a bone ensured, as if during a surgery, Weller endoprosthesis was implanted in the channel of the bone model using the Palacos R surgical cement.

Three holes with a 1 mm diameter were previously bored in the bone model, into which K type thermocouples (NiCr-NiAl) with 0.25 mm diameter wires were inserted. Thermocouples were located in a way that made it possible to record polymerizable cement temperature at the boundary of contact with "the bone" in the area of the upper part of the endoprosthesis stem, its middle and at the bottom, below the stem end. Resin was used as the bone modelling material because its thermal properties are similar to those of the bone. Thermal conductivity coefficient λ for polyester resin is 0.2÷0.4 W/(m K) and λ of the bone varies between 0.26 and 0.60 W/(m K). The specific heat of polyester resin, c = 1200÷2400 J/(kg K), is comparable to the bone's specific heat, i.e. c = 1260÷2370 J/(kg K). The resin density is also similar to the bone density: density p of the resin varies in the range of 1100÷1400 kg/m³, and bone density p in the range of 1000÷2900 kg/m³ [31,34,35]. Diagrams of the obtained cement polymerization temperature values as a function of time are shown in FIGs 3 and 4.



RYS. 4. Zmiana temperatury polimeryzacji w czasie dla cementu Palacos R modyfikowanego węglem szklistym [34,35].

FIG. 4. Change of polymerization temperature in course of time for Palacos R cement with a glassy carbon addition [34,35].

Na podstawie wyników wszystkich przeprowadzonych badań zależności temperatury polimeryzacji cementu od czasu stwierdzono, iż po domieszkowaniu cementu kostnego węglem szklistym maksymalna temperatura polimeryzacji uległa obniżeniu. Równocześnie zaobserwowano przesunięcie w stronę mniejszego czasu krzywych polimeryzacji dla cementu modyfikowanego węglem szklistym w stosunku do cementu niemodyfikowanego (RYS. 3 i 4). Oznacza to skrócenie czasu utwardzania się cementu po zastosowaniu domieszki węgla szklistego.

Zmniejszenie czasu utwardzania się cementu modyfikowanego oznacza konieczność zwiększenia szybkości wprowadzania tego cementu do kanału kości udowej podczas przeprowadzania zabiegu implantacji stawu biodrowego.

Ocena trwałości cementu chirurgicznego na podstawie wyników badań zmęczeniowych niskocyklowych

Zjawisko niszczenia cementu podczas ruchu człowieka odbywa się pod wpływem cyklicznych zmian obciążeń o dużych wartościach, a więc można je z dużym prawdopodobieństwem określić jako zmęczenie w zakresie małej liczby cykli. W materiałach lepkosprężystych zaleca się wywoływanie obciążenia w postaci zadanego odkształcenia (obciążenie kinematyczne). Mając to na uwadze, w realizowanych badaniach zmęczeniowych niskocyklowych ustalono sposób obciążania próbek z cementu chirurgicznego, polegający na sterowaniu przemieszczeniem, a w późniejszych badaniach – odkształceniem. Taki sposób realizacji badań zmęczeniowych pozwolił na zamodelowanie zjawiska cyklicznej relaksacji, charakterystycznej dla kompozytów polimerowych, do których należy badany cement chirurgiczny. Skłonność do cyklicznej relaksacji podczas obciążania cementu chirurgicznego oraz jego powrotu do stanu początkowego po odciążaniu ma duże znaczenie dla biofunkcjonalności sztucznego stawu biodrowego. Po okresie odpoczynku cement może być bowiem ponownie obciążany siłami o wartościach jak na początku całego procesu. Te cechy cementu sprawiają, że u pacjenta po okresie aktywności ruchowej, podczas której cement zrelaksował, w okresie odpoczynku następuje "regeneracja" materiału [7.30].

Podstawowym zjawiskiem reologicznym w cemencie, który jest materiałem lepkosprężystym, jest wzrost odkształceń w warunkach pełzania. Odkształcenia kumulujące się podczas okresu aktywności pacjenta mają tendencję do powrotu do stanu wyjściowego podczas okresu odpoczynku. Zjawisko to powtarza sie, dopóki w cemencie nie wystąpią zmiany uniemożliwiające funkcjonowanie implantu. Odkształceniu cementu, spowodowanemu pełzaniem, towarzyszy osiadanie trzpienia endoprotezy, a generowanie naprężeń promieniowych i obwodowych w otaczającej kości korowej wywołuje remodeling kości. To z kolei może spowodować większe pełzanie cementu i osiadanie trzpienia protezy. Dla praktyki klinicznej bardzo ważne jest oszacowanie wartości odkształcenia cementu i osiadania protezy w czasie eksploatacji. Całkowita bowiem wielkość osiadania protezy w cemencie po wielu latach jej użytkowania ma wpływ na trwałość cementowej endoprotezoplastyki [36].

Zjawisko cyklicznego pełzania cementu zamodelowano, prowadząc badania zmęczeniowe niskocyklowe przy sterowaniu obciażeniem.

Badania zmęczeniowe niskocyklowe prowadzono na maszynie serwohydraulicznej MTS-810. Maszyna wyposażona jest w system cyfrowego sterowania Test STAR II. W celu zapewnienia dokładnego zbierania wartości siły i odkształcenia badania realizowane były przy wykorzystaniu programu TestWARE SX. Zmianę obciążenia zamodelowano cyklem trójkątnym o częstotliwości 0,25 Hz (RYS. 5). Based on the results of the conducted examinations of the dependence of the cement polymerization temperature on time, it was concluded that after glassy carbon had been added to bone cement, the maximum polymerization temperature decreased. A shift in the direction of the shorter time of polymerization curves for cement modified with glassy carbon, compared to non-modified cement, was also observed (FIG. 3 and FIG. 4). This means that the cement curing time shortens after adding glassy carbon.

Shortening of the modified cement curing time means that it is necessary to increase the speed at which this cement is inserted into the femoral bone channel during implantation of a hip joint.

Assessment of the durability of surgical cement based on the results of low-cycle fatigue tests

The phenomenon of cement degradation during a person's movement takes place under the action of cyclic changes of high loads. Therefore, they can be defined with high probability as fatigue in the range of a small number of cycles. It is recommended for viscoelastic materials to induce load in the form a predefined strain (kinematic load). With this in mind, in the performed low-cycle fatigue tests, a method was established of loading surgical cement specimens which consists in dislocation control and, in further tests, in deformation control. Such a method of carrying out fatigue tests enabled the modelling of the cyclic relaxation phenomenon, characteristic of polymer composites which include the investigated surgical cement. Tendency to cyclic relaxation during loading of surgical cement and its return to the initial state after unloading is very important for the biofunctionality of an artificial hip joint. This is because after a period of rest forces with the same values in the beginning of the entire process can be reapplied to cement. These cement properties cause material "regeneration" during rest after a period of patient's physical activity, during which cement relaxed [7,30].

The main rheological phenomenon in cement (which is a viscoelastic material) is an increase in deformations in creep conditions. Deformations accumulating during the patient's activity tend to return to the initial state during a rest period. This phenomenon is repeated until cement changes in a way which makes functioning of the implant impossible. Cement deformation caused by creep is accompanied by the subsidence of the endoprosthesis stem, while the generation of radial and circumferential stresses in the surrounding cortical bone causes bone remodelling. This in turn may cause more intense cement creep and the subsiding of the prosthesis stem. The estimation of the value of cement deformation and prosthesis subsiding during operation is very important for the clinical practice. This is because the total extent of prosthesis subsidence in cement after many years in use affects the durability of the endoprosthesoplasty [36].

The phenomenon of cyclic creep of cement was modelled by performing low-cycle fatigue tests with load control.

Low-cycle fatigue tests were conducted on an MTS-810 servo-hydraulic machine. The machine is equipped with a digital control system, Test STAR II. In order to ensure precise measurements of values of force and deformation, the tests were carried out using the TestWARE SX software. A change in load was modelled with a triangular cycle with a frequency of 0.25 Hz (FIG. 5). An extensometer with a 25 mm base was used in the tests. Cyclic loading of specimens in the range of action of tensile stresses was adopted for the tests. The action of tensile stresses in bone cement usually causes cement cracking in the proximal area of the bone-stem system [7,21]. The following maximum tensile stress values were assumed: 17 MPa, which corresponds to approximately 50% of tensile strength, and 26 MPa, which corresponds to c. 80% of bone cement tensile strength [7,25,26].

Do badań wykorzystano ekstensometr o bazie 25 mm.
 W badaniach przyjęto cykliczne obciążanie próbek w zakresie działania naprężeń rozciągających. Działanie naprężeń rozciągających w cemencie kostnym powoduje najczęściej pękanie cementu w obszarze proksymalnym układu kośćtrzpień [7,21]. Przyjęto wartości maksymalnych naprężeń rozciągających 17 MPa, co stanowi ok. 50% wytrzymałości na rozciąganie oraz 26 MPa, co stanowi ok. 80% wytrzymałości na rozciąganie cementu kostnego [7,25,26].

Na podstawie przeprowadzonych badań zmęczeniowych wykonano wykresy w układzie naprężenie-odkształcenie dla różnej liczby cykli. Miały one kształt pętli histerezy, co tłumaczy się naturą lepkosprężystego zachowania się cementu kostnego. Zaobserwowano zjawisko przemieszczania się pętli histerezy oraz zmniejszanie się ich kąta pochylenia wraz ze wzrostem liczby cykli. Zjawisko pochylania pętli histerezy opisuje się zmianą dynamicznego modułu sprężystości wraz ze wzrostem liczby cykli. Wartości dynamicznego modułu sprężystości wyznaczono na podstawie siecznych przeprowadzonych przez pętle histerezy.

Badania zmęczeniowe niskocyklowe cementu w stanie wyjściowym

Zjawisko przemieszczania się pętli histerezy zaobserwowano zarówno dla cementu kostnego niemodyfikowanego, jak i cementu po modyfikacji węglem szklistym. Tłumaczy się to występowaniem w tym materiale zjawiska cyklicznego pełzania. Stwierdzono, iż domieszka węgla szklistego ogranicza skłonność cementu do cyklicznego pełzania (RYS. 6, 7, 8, 9). Zostało to potwierdzone krzywymi cyklicznego pełzania uzyskanymi z wartości granicznych odkształceń cementu dla pętli histerezy przy wzrastającej liczbie cykli, a więc wzrastającym czasie t (RYS. 9). Z krzywych tych wynika, iż prędkość pełzania dla cementu po modyfikacji węglem szklistym uległa zmniejszeniu z $\dot{\mathcal{E}}$ = 6 10⁻⁸ 1/s do $\mathcal{E} = 4.10^{-8}$ 1/s. Wartości dynamicznego modułu sprężystości wyznaczone dla cementu Biomet Plus domieszkowanego węglem szklistym podlegały mniejszym zmianom wraz z liczbą cykli, niż dla cementu niemodyfikowanego i przyjmowały wyższe wartości [16,22,25,26].

Badania zmęczeniowe niskocyklowe cementu starzonego w roztworze Ringera

Badania zmęczeniowe niskocyklowe przeprowadzono także na próbkach z cementu kostnego niemodyfikowanego i modyfikowanego węglem szklistym o udziale 1,6% mas., po starzeniu w roztworze Ringera o temperaturze 37°C przez okres 10 tygodni. Środowisko to miało odzwierciedlać warunki panujące w organizmie człowieka, a więc zarówno obecność płynów ustrojowych, jak i temperatury organizmu. Badania zmęczeniowe niskocyklowe przeprowadzono przy takich samych parametrach jak dla próbek w stanie wyjściowym - przy naprężeniu rozciągającym σ_{max} = 17 MPa oraz σ_{max} = 26 MPa.

Wszystkie materiały po moczeniu w roztworze Ringera, poddane obciążeniom zmęczeniowym zachowały cechy lepkosprężyste. Krzywe uzyskane z badań zmęczeniowych niskocyklowych w układzie naprężenie-odkształcenie miały kształt pętli histerezy. Zaobserwowano także zjawisko przemieszczania się pętli histerezy oraz zmniejszanie się kąta pochylenia wraz ze wzrostem liczby cykli. Cement kostny Biomet Plus domieszkowany węglem szklistym (1,6% mas.) po moczeniu w roztworze Ringera wykazuje wyższą wartość dynamicznego modułu sprężystości w porównaniu z cementem bez domieszki (RYS. 10). Cement modyfikowany po moczeniu w roztworze Ringera zachował zdolność do pełzania porównywalną do cementu w stanie wyjściowym (RYS. 11). Świadczy to o tym, że domieszka węgla szklistego w cemencie kostnym ograniczyła postęp procesu starzenia.



RYS. 5. Trójkątny cykl obciążeń w badaniach zmęczeniowych. FIG. 5. Triangle shaped cycle of load in fatigue tests.

Diagrams in the stress-deformation system were made based on the performed fatigue tests for a various number of cycles. They had a shape of a hysteresis loop, which is explained by the nature of the viscoelastic behaviour of bone cement. A phenomenon of the dislocation of hysteresis loops and a decrease in their inclination angle along with an increase in the number of cycles were observed. The phenomenon of inclination of a hysteresis loop is described with a change of the dynamic elasticity modulus along with an increase in the number of cycles. Values of the dynamic elasticity modulus were determined based on secants plotted by hysteresis loops.

Low-cycle fatigue tests of cement in the initial state

The phenomenon of dislocation of a hysteresis loop was observed both for non-modified bone cement and for cement modified with glassy carbon. This is explained by the occurrence of the cyclic creep phenomenon in this material. It was concluded that the addition of glassy carbon limits the tendency of cement to cyclic creep (FIGs. 6, 7, 8 and 9). This was confirmed by cyclic creep curves obtained from boundary values of cement deformation for a hysteresis loop with a rising number of cycles and thus increasing time t (FIG. 9). According to these curves the creep rate for cement modified with glassy carbon decreased from $\dot{\mathcal{E}}$ = 6.10⁻⁸ 1/s to $\dot{\mathcal{E}}$ = 4.10⁻⁸ 1/s. Values of the dynamic modulus of elasticity determined for the Biomet Plus cement with a glassy carbon additive were subjected to smaller changes along with the number of cycles than for non-modified cement and assumed higher values [16,22,25,26].

Low-cycle fatigue tests of cement aged in Ringer's solution

Low-cycle fatigue tests were also carried out on specimens of non-modified bone cement and cement modified with glassy carbon with a 1.6% w/w fraction after ageing for 10 weeks in Ringer's solution at a temperature of 37°C. This environment was supposed to reflect the conditions present in the human organism, i.e. the organism's temperature and the presence of body fluids. Low-cycle fatigue tests were performed with the same parameters as for specimens in the initial state: at tensile stress σ_{max} = 17 MPa and σ_{max} = 26 MPa.

All materials soaked in Ringer's solution and subjected to fatigue stresses retained viscoelastic properties. Curves obtained from low-cycle fatigue tests in the stress-deformation system had a shape of a hysteresis loop. A phenomenon of the hysteresis loop dislocation and a decrease in the inclination angle along with an increase in cycle number were also observed. After soaking in Ringer's solution the Biomet Plus bone cement doped with glassy carbon (1.6% w/w) demonstrates a higher value of the dynamic elasticity modulus than non-doped cement (FIG. 10). Modified cement soaked in Ringer's solution retained the susceptibility to creep comparable to that of cement in the initial state (FIG. 11). This indicates that a glassy carbon additive in bone cement limited the progress of the ageing process.

MGINERING OF MATERIALS



RYS. 6. Przykładowe pętle histerezy po różnej liczbie cykli zarejestrowane podczas badań zmęczeniowych niskocyklowych próbek z cementu Biomet Plus przy naprężeniu $\sigma_{max} = 26$ MPa [25,26].

FIG. 6. Histeresis loops after a different number of cycles with the dynamic modulus values E_d , for Biomet Plus cement; $\sigma_{max} = 26$ MPa [25,26].



dynamic modulus of elasticity Ed [MPa]

dynamiczny moduł sprężystości /

4400

4300

4200

4100

4000

3900

3800 3700

1

-Biomet Plus -Biomet Plus +3,1% wag. C

1000 2000 3000 4000 5000 6000 7000

liczba cykli / number of cycles N

histerezy po różnej liczbie cykli zarejestrowane podczas badań zmęczeniowych niskocyklowych próbek z cementu Biomet Plus modyfikowanego węglem szklistym (3,1% wag.) przy naprężeniu $\sigma_{max} = 26$ MPa [25,26]. FIG. 7. Histeresis loops after a different number of cycles with the dynamic modulus values E_d, for Biomet Plus cement with a glassy carbon addition (3.1% mas.); $\sigma_{max} =$ 26 MPa [25,26].

RYS. 7. Przykładowe pętle

RYS. 8. Zmiany dynamicznego modułu sprężystości w zależności od liczby cykli dla cementu Biomet Plus i Biomet Plus po modyfikacji węglem szklistym (3,1% mas.) [25,26].

FIG. 8. The dynamic modulus of elasticity E_d changing with a growing number of cycles N for the Biomet Plus cement and Biomet Plus cement with glassy carbon addition (3.1% mas.) [25,26].





RYS. 10. Zmiany dynamicznego modułu sprężystości w zależności od liczby cykli dla cementu Biomet Plus i Biomet Plus modyfikowanego węglem szklistym (1,6% mas.) po starzeniu w roztworze Ringera o temp. 37°C; σ_{max} = 17 MPa [25,26]. FIG. 10. The dynamic modulus of elasticity E_d changing

with a growing number of cycles N for the Biomet cement and Biomet cement with glassy carbon addition (1.6% mas.) after ageing in Ringer's solution at 37°C; σ_{max} = 17 MPa [25,26].

RYS. 11. Krzywe cyklicznego pelzania cementu chirurgicznego Biomet Plus i Biomet Plus modyfikowanego węglem szklistym po starzeniu w roztworze Ringera o temperaturze 37°C; σ_{max} = 26 MPa [25,26].

FIG. 11. Diagrams of cyclic creep of surgical cement **Biomet Plus and Biomet** Plus with glassy carbon after ageing in Ringer's solution at 37°C; σ_{max} = 26 MPa [25,26].



22

ш

Badania zmęczeniowe niskocyklowe cementu po naświetlaniu promieniami RTG

Badania zmęczeniowe niskocyklowe przeprowadzono również na próbkach z cementu kostnego w stanie niemodyfikowanym i po modyfikacji węglem szklistym o udziale 1,6% mas. naświetlanych promieniami RTG. Środowisko to miało odzwierciedlać warunki, w jakich cement kostny służący do mocowania endoprotez poddawany jest naświetlaniu w czasie przeprowadzania kontrolnych badań rentgenowskich pacjentów. Badania zmęczeniowe przeprowadzono przy takich samych parametrach jak dla próbek w stanie wyjściowym i po starzeniu w roztworze Ringera. Cement kostny po naświetlaniu promieniowaniem rentgenowskim zachował charakter materiału lepkosprężystego. Krzywe uzyskane z badań zmeczeniowych niskocyklowych w układzie naprężenie-odkształcenie również miały kształt pętli histerezy. Zaobserwowano także zjawisko przemieszczania się pętli histerezy oraz zmniejszanie się kąta pochylenia wraz ze wzrostem liczby cykli. Promieniowanie RTG ograniczyło wyraźnie zdolność odkształcania się materiału w porównaniu ze środowiskiem mokrym, w którym cement kostny jest bardziej podatny na pełzanie.

Cement kostny niemodyfikowany po naświetlaniu promieniowaniem RTG wykazuje wyższą wartość dynamicznego modułu sprężystości w porównaniu z cementem modyfikowanym (RYS. 12). Promieniowanie RTG spowodowało, że cement kostny niemodyfikowany stał się kruchy. Monomer wydzielający się podczas rozpadu łańcucha polimerowego cementu kostnego po wpływem działania promieni RTG prawdopodobnie zdążył wyparować, nie dając efektu uplastycznienia.

Na podstawie krzywych cyklicznego pełzania, skonstruowanych dla badanych cementów (RYS. 13) można stwierdzić, iż cement Biomet Plus domieszkowany węglem szklistym zachował lepsze właściwości lepkosprężyste po promieniowaniu RTG, niż cement bez domieszki. Wynika stąd, że domieszka w postaci węgla szklistego ograniczyła postęp procesu starzenia pod wpływem promieniowania RTG.

Low-cycle fatigue tests of cement exposed to X-rays

Low-cycle fatigue tests were also carried out on specimens of non-modified bone cement and cement modified with glassy carbon with a 1.6% w/w fraction and exposed to X-rays. This environment was supposed to reflect the conditions of exposure of bone cement used for fixing endoprostheses to X-rays during check-up examinations of patients. Fatigue tests were performed with the same parameters as in the case of specimens in the initial state and after ageing in Ringer's solution. Bone cement exposed to X-rays retained its character as a viscoelastic material. Curves obtained from low-cycle fatigue tests in the stressdeformation system also had a shape of a hysteresis loop. A phenomenon of the hysteresis loop dislocation and a decrease in the inclination angle along with an increase in the number of cycles were also observed. X-ray radiation significantly reduced the material's deformability compared to a wet environment in which bone cement is more susceptible to creep.

Non-modified bone cement exposed to X-rays demonstrates a higher value of the dynamic elasticity modulus than modified cement (FIG. 12). X-ray radiation caused non-modified bone cement to become brittle. Monomer released during the decomposition of the polymer chain of bone cement under the influence of X-rays probably evaporated without any plasticization effect.

Based on cyclic creep curves constructed for the examined cements (FIG. 13) it can be concluded that the Biomet Plus cement doped with glassy carbon retained better viscoelastic properties after exposure to X-rays than non-doped cement. It follows that a glassy carbon additive limited the progress of the ageing process under the influence of X-ray radiation.



24

Zastosowanie modelu reologicznego do oceny zjawiska cyklicznego pełzania w cemencie chirurgicznym

Zjawisko cyklicznego pełzania cementu kostnego, jakie zaobserwowano podczas badań zmęczeniowych niskocyklowych, opisano matematycznie, wykorzystując model reologiczny standardowy. Obliczenia przeprowadzono przy wykorzystaniu programu matematycznego "Mathcad 14". Zagadnienie to jest kontynuacją zagadnienia, realizowanego wcześniej w pracy [7].

Ogólne równanie opisujące model standardowy ma postać [38]:

$$\varepsilon(t) = \sigma_0 / E_I + \sum_{i=1}^n \{ (\sigma_0 / E_i) \ [1 - \exp(-t / \upsilon_i)] \} + \sigma_0 t / \eta$$
(1)

Przy założeniu, że n = 1 równanie (1) przyjmuje postać: $\varepsilon(t) = \sigma_0(t) / E_t + (\sigma_0(t) / E_d(t)) \{1 - \exp[-t E_1(t) / \eta]\} + \sigma_0(t) t / \eta$

(2)

gdzie:

 σ_o - naprężenie,

E₁, E₁ - moduły sprężystości podłużnej,

- η współczynnik lepkości,
- t czas,
- $\upsilon_1 = \eta / E_1$

Równaniu (2) odpowiada model mechaniczny przedstawiony na RYS. 14.



RYS. 14. Model standardowy dla liczby elementów n = 1 [38].

FIG. 14. Standard model for number of elements n = 1 [38].

Aby zbudować model matematyczny zjawiska cyklicznego pełzania, we wzorze (2) wprowadzono odpowiednie wielkości naprężeń i modułu zależne od czasu. W miejsce σ_0 wprowadzono więc następujące równanie, modelujące cykl naprężeń:

$$\sigma_0(t) = A\sigma_a\{1,55 + \arcsin[\sin(\omega(t+3))]\}$$

(3)

adzie:

 σ_a = 12,9 MPa - amplituda naprężenia dla próbki o średnicy d = 9 mm i przyjętej sile F_{max} = 1640 N (F_{min} = 0), naprężenie Δσ = 25,8 MPa, a więc σ_a = Δσ/2 = 12,9 MPa,

 $\omega = 0.5\pi$ (1/s) - wartość, jaką przyjęto w badaniach zmęczeniowych niskocyklowych,

t (s) – czas,

A = 0,641 - stała dopasowująca wartości $\Delta \sigma$ do założonej wartości $\Delta \sigma$ = 25,8 MPa.

Wykres zamodelowanego za pomocą równania (3) cyklu naprężeń przedstawiono na RYS. 15.

Use of the rheological model in the evaluation of the cyclic creep phenomenon in surgical cement

The phenomenon of the cyclic creep of bone cement was observed during low-cycle fatigue tests and described mathematically by using the standard rheological model. Calculations were carried out using the "Mathcad 14" mathematical programme. This is the continuation of the issue discussed earlier in the paper [7].

The general equation describing the standard model looks like follows [38]:

$$\varepsilon(t) = \sigma_0 / E_I + \sum_{i=1}^n \{ (\sigma_0 / E_i) \ [1 - \exp(-t / \upsilon_i)] \} + \sigma_0 t / \eta$$
(1)

Assuming that n = 1, equation (1) adopts the following form:

$$\varepsilon(t) = \sigma_0(t) / E_I + (\sigma_0(t) / E_d(t)) \{1 - \exp[-t E_1(t) / \eta]\} + \sigma_0(t) t / \eta$$

(2)

 σ_{o} - stress,

where:

 E_1 , E_1 - elastic modulus,

η - viscosity coefficient,

t - time,

The mechanical model shown in FIG. 14 corresponds to equation (2).



RYS. 15. Model cyklu naprężeń w badaniach zmęczeniowych cementu chirurgicznego według równania (3) [7,25,26].

FIG. 15. Model of stress cycle at fatigue tests for surgical cement according to equation (3) [7,25,26].

In order to build the mathematical model of the cyclic creep phenomenon suitable time-dependent values of stresses and the modulus were introduced in formula (2). Therefore, the following equation, which models the stress cycle, was inserted instead of σ_0 .

$$\sigma_0(t) = A\sigma_a\{1,55 + \arcsin[\sin(\omega(t+3))]\}$$
(3)

where:

 σ_a = 12.9 MPa – stress amplitude for a specimen with diameter d = 9 mm and adopted force F_{max} = 1640 N (F_{min} = 0), stress $\Delta\sigma$ = 25.8 MPa, thus σ_a = $\Delta\sigma/2$ = 12.9 MPa,

 ω = 0.5 π (1/s) – value adopted in low-cycle fatigue tests,

t (s) - time,

A = 0.641 - constant adjusting values $\Delta\sigma$ to adopted value $\Delta\sigma$ = 25.8 MPa.

Diagram modelled using equation (3) of the stress cycle is shown in FIG. 15.

W równaniu (2) przyjęto za E_1 dynamiczny moduł sprężystości $E_d(t)$. Równanie modelujące zjawisko cyklicznego pełzania cementu kostnego przyjmuje postać (4) [7]:

$$\varepsilon(t) = \sigma_0(t) / E_1 + (\sigma_0(t) / E_d(t)) \{1 - \exp[-t E_1(t) / \eta]\} + \sigma_0(t) t / \eta$$
(4)

W równaniu (4) przyjęto za E₁ dane E_d dla pierwszego cyklu obciążenia. Dla cementu Biomet Plus przyjęto E₁=4165 MPa, a dla cementu Biomet Plus modyfikowanego węglem szklistym E₁=4502 MPa. Za E_d(t) przyjęto funkcję E_d(t) zgodnie z RYS. 16. Dla cementu, jak dla polimeru w stanie stałym, przyjęto $\eta = 10^{10}$ MPa·s.

Uzyskane według równania (4) zależności ε = f(t) dla przedziału czasu t do 200 000 s przedstawiono na RYS. 17. Wykresy te obrazują zjawisko cyklicznego pełzania cementu chirurgicznego niemodyfikowanego oraz modyfikowanego węglem szklistym.

Opracowany model matematyczny zjawiska cyklicznego pełzania w cemencie dobrze opisuje wyniki badań zmęczeniowych w przedziale czasu t do 4·10⁵ s [7], odpowiadającemu zakresowi badań zmęczeniowych niskocyklowych. W przypadku dużych wartości t wykorzystywane zależności tracą sens fizyczny.

Na podstawie wyników obliczeń stwierdzono korzystny wpływ domieszki węgla szklistego na zjawisko pełzania w cemencie. Węgiel szklisty zmniejsza przyrost odkształceń w czasie, ograniczając pełzanie materiału. Z medycznego punktu widzenia oczekuje się zatem zwiększenia trwałości mocowania endoprotezy stawu biodrowego, gdyż mniejsze odkształcenia cementu w procesie pełzania wiążą się z mniejszym osiadaniem trzpienia.

Biomet Plus ____

-

4600

4400

4200

4000

3800

3600

0

4000

8000

Ed (MPa)

Biomet Plus+3,1% mas.C

 $E_1 = 4^{*}10^{-7}t^{2} - 0,0128t + 4505,9$

 $E_1 = 3^{*}10^{-7}t^2 - 0 0174t + 4170.8$

czas / time t (s)

12000 16000



$$\varepsilon(t) = \sigma_0(t) / E_I + (\sigma_0(t) / E_d(t)) \{1 - \exp[-t E_1(t) / \eta]\} + \sigma_0(t) t / \eta$$
(4)

In equation (4) E_d data for the first stress cycle was adopted as E_i . E_i = 4165 MPa was adopted for the Biomet Plus cement, and E_i = 4502 MPa for Biomet Plus modified with glassy carbon. In accordance with FIG. 16, function E_d (t) was adopted as E_d (t); η = 10¹⁰ MPa s was adopted for cement, just like for solid polymer.

Dependences $\varepsilon = f(t)$ for time interval t up to 200,000 s, obtained in accordance with equation (4), are shown in FIG. 17. These diagrams illustrate the phenomenon of the cyclic creep of non-modified surgical cement and cement modified with glassy carbon.

The developed mathematical model of the cyclic creep phenomenon in cement describes well the results of fatigues tests in time interval t to $4 \cdot 10^5$ s [7], which corresponds to the scope of low-cycle fatigue tests. In the case of high t values the applied dependences lose their physical meaning.

The advantageous influence of the glassy carbon additive on creep in cement was found based on calculation results. Glassy carbon decreases deformation growth over time by limiting material creep. Therefore, improvement of durability of the hip joint endoprosthesis fixation is expected from the medical point of view, for smaller deformations of cement during the creep process mean reduced subsidence of the endoprosthesis stem.

RYS. 16. Zależność dynamicznego modułu sprężystości od czasu dla cementu Biomet Plus i Biomet Plus modyfikowanego węglem szklistym (3,1% wag.) [25,26].

FIG. 16. The dynamic modulus of elasticity E_d relative to time for the Biomet Plus cement and Biomet Plus cement with glassy carbon addition (3.1% w/w) [25,26].



20000

RYS. 17. Wykresy cyklicznego pełzania cementu chirurgicznego Biomet Plus niemodyfikowanego (a) i modyfikowanego węglem szklistym (b) dla modelu standardowego według równania (4) [25,26,37]. FIG. 17. Diagrams of cycle creep of surgical cement Biomet Plus (a) and Biomet Plus with glassy carbon addition (b) for standard model according to equation (4) [25,26,37]. BIC MATERIALS

Badania reakcji organizmu na wszczepy implantowane
 do kości udowych królików, wykonane z cementu chirurgicznego modyfikowanego węglem szklistym

Przydatność opracowanych kompozytów polimerowych na bazie cementu chirurgicznego do zastosowania w ortopedii podlegała weryfikacji "in vivo". Przeprowadzono badania reakcji organizmu na wszczepy z cementu zmodyfikowanego węglem szklistym.

Na badania eksperymentalne uzyskano zezwolenie Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Badania realizowano na 15 królikach rasy "biały nowozelandzki" w pomieszczeniach hodowlanych oraz bloku operacyjnym Centrum Medycyny Doświadczalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach.

Implantowano cement czysty oraz z domieszką węgla szklistego do kości udowych królików. Implant miał średnicę 3 mm i długość, a zarazem głębokość wprowadzenia 8 mm.

Badana populacja zwierząt (15 sztuk) została podzielona na trzy równoliczne grupy, takie jak:

I - Grupa kontrolna 5 sztuk – implantacja cementu nie modyfikowanego – czas obserwacji 6 miesięcy,

II - Grupa doświadczalna 5 sztuk – implantacja cementu modyfikowanego – czas obserwacji 3 miesiące,

III - Grupa doświadczalna 5 sztuk – implantacja cementu modyfikowanego – czas obserwacji 6 miesięcy.

Po zakończeniu obserwacji doświadczalnych zwierzęta poddano eutanazji i w warunkach badania sekcyjnego pobrano materiał (kość udowa) do dalszych badań laboratoryjnych (mikroskopia skaningowa i badania histopatologiczne). Po zakończeniu badań szczątki zwierzęce przekazano do specjalistycznej firmy celem utylizacji.

Opis zmian biologicznych na podstawie badania histopatologicznego badanych tkanek

Badanie zmian histopatologicznych tkanek pobranych od zwierząt doświadczalnych (RYS. 18) przeprowadzono w Pracowni Badań Mikroskopowych "DIAGNO-MED" w Siemianowicach Śląskich. Badania histopatologiczne wykonano, wykorzystując tkanki wszystkich badanych królików według identycznej procedury laboratoryjnej.

Pobrane fragmenty tkankowe utrwalono w sposób standardowy w zbuforowanym 10% roztworze formaliny. Wycinki pobierano z miejsca wszczepienia cementu. W pierwszej kolejności wycięto tkanki miękkie z okolicy miejsca wszczepu. Elementy kostne przecięto piłką włosową w połowie długości wszczepu, pozostawiając połowę wszczepu do dalszych badań. Pobrane fragmenty kostne poddano procesowi

odwapnienia w preparacie Decalcifier II firmy Surgipeth (EDTA + Hydrochloric acid). Proces odwapnienia trwał 48 do 72 godzin. Po odwapnieniu preparaty kostne i tkanki miękkie poddano dalszej obróbce w mikroprocesorze tkankowym ASP300 firmy Leica. Po obróbce pobrane tkanki zatopiono w bloczki parafinowe. Następnie skrojono je na mikrotomie rotacyjnym firmy Leica. Wykonane preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną w sposób standardowy i po nakryciu poddano ocenie w mikroskopie świetlnym. Opis preparatów histologicznych przeprowadzono, dzieląc je na dwie grupy: tkanki miękkie i tkankę kostną (RYS. 19-22) [26].



RYS. 18. Kość udowa królika z wszczepionym cementem modyfikowanym węglem szklistym [26]. FIG. 18. The rabbit femur with implanted cement modified with glassy carbon [26].

Examination of the reactions of the rabbit's organism to implants made of surgical cement modified with glassy carbon implanted into the femoral bone

The usefulness of the developed polymer composites based on surgical cement to be used in orthopaedics was verified "in vivo". Reactions of organisms to implants made of cement modified with glassy carbon were examined.

Experimental tests were permitted by the Local Ethics Commission for Experiments on Animals. Tests were carried out on 15 New Zealand white rabbits in animal rooms and the operating theatre of the Experimental Medicine Centre of the Medical University of Silesia in Katowice.

Pure cement and cement doped with glassy carbon were implanted into femoral bones of rabbits. An implant had a 3 mm diameter, while its length, and at the same time the insertion depth, was 8 mm.

The examined animal population (15 specimens) was divided into the following three equinumerous groups:

I – Control group (5 specimens) – non-modified cement implantation – observation time: 6 months;

II – Experimental group (5 specimens) – modified cement implantation – observation time: 3 months;

III – Experimental group (5 specimens) – modified cement implantation – observation time: 6 months;

After the experimental observations had been completed, the animals were euthanized and the material (femoral bone) was extracted during autopsy for further laboratory examinations (scanning microscopy and histopathological examinations). Once the examinations had been finished, the animal remains were transferred to a specialist company for disposal.

Description of biological changes based on the

histopathological examination of the investigated tissues The examination of histopathological changes in tissues extracted from laboratory animals (FIG. 18) was performed at Microscopic Examination Laboratory "DIAGNO-MED" in Siemianowice Śląskie. The histopathological examinations were performed on tissues of all the examined rabbits using the same laboratory procedure.

The extracted tissue fragments were preserved in a standard way in a 10% formalin buffered solution. The segments were extracted from the cement implantation area. Soft tissues from the vicinity of the implant area were excised first. Bone elements were cut through with a fretsaw in the middle of the implant length; a half of the implant was left for further tests. The extracted bone fragments were subjected

to decalcification in the Decalcifier II preparation produced by the Surgipeth company (EDTA + Hydrochloric acid). The process lasted from 48 to 72 hours. After decalcification, the bone preparations and soft tissues underwent further processing in a Leica tissue processor, ASP300. After processing the extracted tissues were submerged in paraffin blocks and next, cut on a rotary microtome produced by Leica. The obtained preparations were dyed with haematoxylin and eosin in a standard manner and were evaluated, after covering, in a light microscope. Histological preparations were described by dividing them into two groups: soft tissues and bones tissue (FIGs. 19-22) [26].



RYS. 19. Fragmenty mięśni oraz młodej tkanki łącznej bez wyraźnego nacieku zapalnego (włóknienie). Drobne skupiska cementu otoczone są drobnymi pasmami tkanki łącznej bez odczynu zapalnego. Ponadto w tkance łącznej widoczne są drobne ogniska włóknienia. Implantacja cementu modyfikowanego, okres obserwacji 3 miesiące [26]. FIG. 19. Portions of the muscle and young connective tissue without apparent inflammatory reaction (fibrosis). Small clumps of cement surrounded by small bands of connective tissue without inflammatory reaction. In addition, the connective tissue visible are a minor outbreak of fibrosis. Implantation of cement modified, observation period 3 months [26].



RYS. 21. Fragment mięśni i tkanki łącznej bez zmian mikroskopowych. Implantacja cementu modyfikowanego, okres obserwacji 6 miesięcy [26]. FIG. 21. A piece of muscle and connective tissue microscopic unchanged. Implantation of cement modified, observation period 6 months [26].

Ze względu na podobieństwo struktury kostnej do tkanki kostnej organizmu człowieka do eksperymentu użyto kości udowe królików (rasy biały nowozelandzki). Pomimo różnic, takich jak wielkość makroskopowa, inny rodzaj unaczynienia, szybszy metabolizm, zgodnie z literaturą zmiany struktury i funkcji kości królika pod wpływem różnych czynników można z pewnym przybliżeniem interpolować na warunki zachodzące w organizmie człowieka [39].



RYS. 20. Fragment kości i szpiku z widocznymi bezpostaciowymi fragmentami "cementu" (wrażenie jakby kość otoczyła cement). Implantacja cementu modyfikowanego, okres obserwacji 3 miesiące [26].

FIG. 20. A piece of bone and bone marrow with fragments of cement (feeling as if a surround of bone cement). Implantation of cement modified, observation period 3 months [26].



RYS. 22. Fragmenty kości zbitej z drobnymi ogniskami barwnika (cementu) na brzegach jednego z wycinków bez wyraźnych zmian mikroskopowych. Implantacja cementu modyfikowanego, okres obserwacji 6 miesięcy [26].

FIG. 22. Bone fragments packed with minor outbreaks of dye (cement) on the banks of one of the slices without clear microscopic changes. Implantation of cement modified, observation period 6 months [26].

Femoral bones of New Zealand white rabbits were used in the experiment because of the similarity of their structure to human bone tissue. In spite of differences, such as the macroscopic size, different vascularisation type and faster metabolism, according to the literature changes in the rabbit bone structure and functions under the influence of various factors can be, with certain approximation, interpolated into conditions in human organisms [39].

Szczególnie ważnym, odkrytym i opisanym w 1950 roku przez szwedzkiego badacza prof. Brånemarka [40], jest zjawisko osteointegracji, definiowane jako strukturalne i funkcjonalne połączenie pomiędzy żywą tkanką kostną a powierzchnią implantu. Zastosowanie dodatku węgla szklistego celem modyfikacji właściwości mechanicznych cementu chirurgicznego jest ważnym kierunkiem badań nad polepszeniem jego funkcji, w tym osteointegracji. Opisywane w piśmiennictwie badania nad zastosowaniem materiałów węglowych kończyły się wynikami potwierdzającymi pozytywny wpływ na poprawienie jego właściwości. Stosowane dodatki węglowe (węgiel szklisty, włókna węglowe) polepszają osteointegrację użytych wszczepów [20,41,42]. Reakcje tkankowe na wszczepy zawierające węgiel szklisty nawet po roku od ich implantacji do tkanki kostnej królika, w ocenie pod mikroskopem świetlnym, były znikome [43]. Świadczy to o tym, że materiał ten może być składnikiem wszczepów, których zadaniem jest długotrwałe pełnienie funkcji w organizmie. Zastosowanie węgla szklistego jako wszczepu do tkanek miękkich (oczodołu) także nie wywołuje miejscowej reakcji tkankowej w badaniu histopatologicznym próbek zwierzęcych, ale co ważne, nie wpływa na parametry krwi [44].

Właściwości węgla szklistego okazały się na tyle przydatne, że wykorzystuje się go do pokrywania powierzchni najnowszych wszczepów dentystycznych – Trabecular Metal- Dental Implants, które imitują strukturę i właściwości kości gąbczastej [42].

Wyniki badań mikroskopowych preparatów histopatologicznych przeprowadzonych w mikroskopie świetlnym nie wykazały cech świadczących o zwiększonym nasileniu procesów patologicznych (niewielkie odczyny zapalne opisywane są także w literaturze [20]). Zarówno w preparatach tkanek miękkich, jaki i w tkance kostnej obu grup badanych oraz grupy kontrolnej zaobserwowano podobne obrazy histologiczne. Różnice dotyczyły jedynie występowania barwnika pochodzącego z implantowanego węgla szklistego w grupach I i III. W każdej z badanych grup (doświadczalnych i kontrolnej) stwierdzono występowanie tkanki kostnej ze zwiększoną ilością i pogrubieniem beleczek kostnych, charakterystycznych dla procesów gojenia się.

Badania mikroskopowe preparatów tkanki kostnej z wszczepionym cementem modyfikowanym węglem szklistym

Z pobranych kości udowych królików wycięto próbki kości z cementem do badań mikroskopowych. Próbki suszono, a następnie napylano złotem.

Badania prowadzono przy pomocy mikroskopu elektronowego skaningowego HITACHI S-4200 (z emisją polową), stosując napięcie przyspieszające 15 kV.

Dokonywano obserwacji obrazów preparatów na granicy kość-cement po 3 oraz po 6 miesiącach od implantacji modyfikowanego węglem szklistym cementu do organizmu królika.

Wykorzystując system EDS (spektroskopii promieniowania rentgenowskiego z dyspersją energii) firmy Noran (System Six), zbadano rozmieszczenie pierwiastków C, P, Ca na powierzchni przekrojów preparatów [26].

Obrazy mikroskopowe powierzchni granicy międzyfazowej pomiędzy kością a cementem modyfikowanym węglem szklistym po 3 i 6 miesiącach od implantacji modyfikowanego cementu wykazały przemieszczanie się cząstek węgla do kości lub wrastanie tkanki kostnej do porów węgla (szeroka strefa granicy międzyfazowej), co pokazano na RYS. 23-25 [26,45].

Świadczy to o korzystnym oddziaływaniu domieszki węgla w cemencie na jego właściwości biologiczne.

The osseointegration phenomenon, which was discovered and described in 1950 by a Swedish researcher, professor Brånemark [40], is particularly important. It is defined as a structural and functional connection between a live bone tissue and the surface of an implant. The use of a glassy carbon additive in order to modify mechanical properties of surgical cement is an important direction of research into the improvement of its functions, including osseointegration. Research into the application of carbon materials which are described in the literature ended in results confirming the positive improvement of its properties. Carbon additives used (glassy carbon, carbon fibres) enhance osseointegration of applied implants [20,41,42]. Tissue reactions to implants which contain glassy carbon even after a year from their implantation into the rabbit bone tissue were minor when evaluated under a light microscope [43]. This shows that this material may be used as a component of implants intended for long-term functioning in an organism. The use of glassy carbon as an implant in soft tissues (the eye socket) does not cause a local tissue reaction in a histopathological examination of animal specimens either, but, importantly, it does not affect blood parameters [44].

Glassy carbon properties proved to be so useful that it is used to cover surfaces of the newest dental implants (Trabecular Metal-Dental Implants), which imitate the structure and properties of the spongy bone [42].

The results of microscopic examinations of histopathological preparations on a light microscope did not reveal any properties that indicate an increased severity of pathological processes (minor inflammatory reactions are also described in the literature [20]). Similar histological images were observed in soft tissue preparations and in the bone tissue of both the examined groups and the control group. The only differences concerned the presence of a dye from the implanted glassy carbon in groups I and III. The presence of bone tissue with an increased quantity and thickening of bone trabeculae, which are characteristic for wound healing processes, was found in each of the examined groups (the control and experimental ones).

Microscopic examination of bone tissue specimens with implemented cement modified with glassy carbon

Specimens of bone with cement were excised for microscopic examination from the extracted rabbit femoral bones. The specimens were dried and sputtered with gold.

The examination was performed on a HITACHI S-4200 scanning electron microscope (with field emission) using an accelerating voltage of 15 kV.

Images of the specimens were observed on the bonecement boundary after 3 and 6 months from implantation of cement modified with glassy carbon into the rabbit organism.

The arrangement of C, P and Ca elements on the surface of specimen sections was examined using a Noran EDS (energy-dispersive X-ray spectroscopy) System Six [26].

Microscopic images of the surface of the interphase boundary between the bone and cement modified with glassy carbon after 3 and 6 months from the implantation of the modified cement indicated a movement of carbon particles into the bone or a growth of the bone tissue into carbon pores (a broad interphase boundary area), as shown in FIGs. 23-25 [26,45].

This testifies to the advantageous influence of a carbon additive in cement on its biological properties.



RYS. 23. Obraz mikroskopowy powierzchni granicy międzyfazowej pomiędzy kością a cementem modyfikowanym węglem szklistym po 3 miesiącach od implantacji modyfikowanego cementu [26]. FIG. 23. Scanning electron microscopy photographs of the boundary between bone and cement modified with glassy carbon after 3 months being in organism rabbit [26].



RYS. 24. Obraz mikroskopowy powierzchni granicy międzyfazowej pomiędzy kością a cementem modyfikowanym węglem szklistym po 6 miesiącach od implantacji modyfikowanego cementu [26]. FIG. 24. Scanning electron microscopy photographs of the boundary between bone and cement modified with glassy carbon after 6 months being in organism rabbit [26].



RYS. 25. Rozmieszczenie pierwiastków C, P, Ca na powierzchni przekrojów preparatów kości z cementem modyfikowanym węglem szklistym po 6 miesiącach od implantacji modyfikowanego cementu [26]. FIG. 25. The location of elements: C, P, Ca on the surface of the cross sections of bone with cement modified with glassy carbon after 6 months being in organism rabbit [26].

BIC MATERIALS

1. Do oceny trwałości cementu kostnego stosowanego do mocowania endoprotez stawów można wykorzystać metodę badań zmęczenia niskocyklowego ze względu na zmęczeniowy charakter oddziaływań w tym materiale podczas ruchu człowieka. W warunkach obciążenia zmęczeniowego niskocyklowego cement na osnowie PMMA modyfikowany domieszką węgla szklistego wykazywał mniejszą prędkość cyklicznego pełzania w porównaniu do cementu bez domieszki.

Z medycznego punktu widzenia oczekuje się zatem zwiększenia trwałości mocowania endoprotezy stawu biodrowego, gdyż mniejsze odkształcenia cementu w procesie pełzania wiążą się z mniejszym osiadaniem trzpienia protezy.

2. Cement modyfikowany węglem szklistym po starzeniu w środowisku roztworu Ringera oraz po naświetlaniu promieniami RTG zachował w większym stopniu swe właściwości lepkosprężyste niż cement bez domieszki. Zatem domieszka węgla szklistego ograniczyła postęp procesu starzenia cementu chirurgicznego.

3. Obrazy mikroskopowe powierzchni granicy międzyfazowej pomiędzy kością a cementem modyfikowanym węglem szklistym po 3 i 6 miesiącach od implantacji modyfikowanego cementu wykazały przemieszczanie się cząstek węgla do kości lub wrastanie tkanki kostnej do porów węgla (szeroka strefa granicy międzyfazowej). Świadczy to o korzystnym oddziaływaniu domieszki węgla w cemencie na jego właściwości biologiczne.

4. Wyniki badań mikroskopowych preparatów histologicznych pobranych z królików doświadczalnych, którym zaimplantowano zmodyfikowany węglem cement nie wykazały cech świadczących o nasileniu procesów patologicznych. Zarówno w preparatach tkanek miękkich, jak i w tkance kostnej obu grup badanych oraz grupy kontrolnej zaobserwowano podobne obrazy histologiczne. W każdej z badanych grup (doświadczalnych i kontrolnej) stwierdzono występowanie tkanki kostnej ze zwiększoną ilością i pogrubieniem beleczek kostnych, charakterystycznych dla procesów gojenia się.

5. Modyfikacja fizyczna cementu kostnego poprzez zastosowanie domieszki węgla szklistego powoduje obniżenie maksymalnej temperatury polimeryzacji. Domieszka węgla szklistego skraca jednak czas utwardzania się modyfikowanego cementu kostnego. Oznacza to konieczność zwiększenia szybkości wprowadzania cementu kostnego do kanału kości udowej podczas zabiegu implantacji stawu biodrowego.

Podziękowania

Badania były wykonane zgodnie z projektem badawczym finansowanym przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N518 383837.

Conclusions

1. The low-cycle fatigue examination method can be applied to evaluate the durability of bone cement used for fixing joint endoprostheses because of the fatigue-like nature of the interactions in that material during a person's movement. Under low-cycle fatigue conditions the PMMA-based cement modified with a glassy carbon additive showed a lower cyclic creep rate compared to cement with no additive.

Therefore, enhanced durability of the hip joint endoprosthesis fixation is expected from the medical point of view, since smaller deformations of cement during the creep process mean reduced subsidence of the endoprosthesis stem.

2. After ageing in Ringer's solution and X-ray exposure the cement modified with glassy carbon retained its viscoelastic properties to a larger degree than the cement with no additive. Therefore, the glassy carbon additive limited the progress of the ageing process of surgical cement.

3. Microscopic images of the surface of the interphase boundary between the bone and the cement modified with glassy carbon after 3 and 6 months from the implantation of the modified cement indicated dislocation of carbon particles into the bone or a growth of the bone tissue into carbon pores (a broad interphase boundary area). This demonstrates the advantageous influence of a carbon additive in cement on its biological properties.

4. The results of microscopic examinations of histological specimens extracted from laboratory rabbits implanted with cement modified with glassy carbon did not reveal any properties which would indicate increased intensity of pathological processes. Similar histological images were observed in both the soft tissue preparations and in the bone tissue of the examined groups, as well as in the control group. The presence of bone tissue with an increased quantity and thickening of bone trabeculae, which are characteristic for wound healing processes, was found in each of the examined groups (the control and experimental ones).

5. A physical modification of bone cement by using a glassy carbon additive caused a decrease in the maximum polymerization temperature. However, a glassy carbon additive shortens the curing time of the modified bone cement. This means that it is necessary to increase the speed at which bone cement is inserted into the femoral bone channel during the hip joint implantation procedure.

Acknowledgements

Research was performed under the research project funded by the Minister of Science and Higher Education No N N518 383837.

Pismiennictwo

References

31

[1] Kühn K-D: Bone Cements. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2000.

[2] Walenkamp G.H.I.M., Murray D.W. (Eds.): Bone Cements and Cementing Technique. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York 2001.

[3] Marciniak J.: Biomateriały. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2013.

[4] Błażewicz S., Chłopek J., Błażewicz M., Pamuła E.: Biomateriały węglowe i kompozytowe. W monografii: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000 (red. Nałęcz M.), t. 4, Biomateriały (red. Błażewicz S.W., Stoch L.). Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003, 331-423.

[5] Polesiński Z., Karaś J.: Cementy kostne i stomatologiczne. W monografii: Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000 (red. Nałęcz M.), t. 4, Biomateriały (red. Błażewicz S.W., Stoch L.). Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003, 179-209.
[6] Łukaszczyk J.: Polimerowe i kompozytowe cementy kostne oraz materiały pokrewne. Polimery 2, 49 (2004) 79-88.

[7] Balin A.: Materiałowo uwarunkowane procesy adaptacyjne i trwałość cementów stosowanych w chirurgii kostnej. Zeszyty Naukowe Politechniki Śląskiej Nr 1610, Hutnictwo z. 69, Gliwice 2004.
[8] Balin A., Toborek J.: Metody kształtowania i oceny właściwości użytkowych cementów chirurgicznych. Inż. Mat. 2 (2007) 83-90.

[9] Graham J., Pruitt L., Ries M., Gundian N.: Fracture and Fatigue Properties of Acrylic Bone Cement. The Journal of Arthroplasty 15, 8 (2000) 1028-1035.

[10] Gierzyńska-Dolna M.: Rola procesów tribologicznych w utracie stabilności endoprotez. Annales Academiae Medicae Silesiensis, supl. 32 (2001) 75-80.

[11] Balin A., Myalski J., Pucka G., Toborek J.: Wpływ domieszki materiału ceramicznego na właściwości fizykochemiczne cementu chirurgicznego. Polimery 51, 11-12 (2006) 852-858.

[12] Knets I., Krilova V., Cimdins R., Berzina L., Vitins V.: Stiffness and strength of composite acrylic bone cements. Achievements in Materials and Manufacturing Engineering 20, 1-2 (2007) 135-138.
[13] Thanner J., Freij-Larsson Ch., Karrholm J., Malchau H., Wesslen B.: Evaluation of Boneloc. Chemical and mechanical properties, and randomized clinical study of 30 total hip arthroplasties. Acta Orthop. Scand. 66, 3 (1995) 207-214.

[14] Yamamoto H., Niwa S., Hori M., Hattori T., Sawai K., Aoki S., Hirano M., Takeuchi H.: Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro. Biomaterials 19 (1998) 1587-1591.

[15] Karas J., Pielka S., Paluch D., Ciołek L., Traczyk S.: Wpływ zastosowanych płynów do zarabiania proszku o składzie: αTCP-DCPD na właściwości fizyczne i biozgodność otrzymywanych cementów kostnych. Engineering of Biomaterials 58-60 (2006) 241-245. [16] Balin A.: Preliminary results of surgical cement modification with glassy carbon. Physiotherapy 16, 2 (2008) 63-69.

[17] Von Grabowski M.T.W., Mittelmeier H.: Aktualne możliwości i perspektywy wykorzystania tworzywa węglowego w chirurgii urazowo-ortopedycznej z uwzględnieniem osteosyntezy trzonów kości długich. Chir. Narz. Ruchu Ortop. Pol. 59, 2 (1994) 34-39.

[18] Fitzer E.: From polymers to polymeric carbon – a way to synthesize a large variety of new materials. Pure & Appl. Chem. 52, Pergamon Press Ltd. (1980). Printed in Great Britain,1865-1882.
[19] Tarvainen T., Pätiälä H., Tunturi T., Paronen I., Lauslahti K., Rokkanen P: Bone growth into glassy carbon implants. A rabbit experiment. Acta Orthop. Scand. 56, 1 (1985) 63-66.

[20] Tarvainen V.T., Tunturi T.O., Paronen I., Lauslahti K.R., Lehtinen E.T., Rokkanen P.U., Rautavuori J., Törmälä P., Pätiälä H.V.: Glassy carbon implant as a bone graft substitute: an experimental study on rabbits. Clin. Mater., 17,2 (1994) 93-98.

[21] Campbell's Operative Orthopaedics, t. IV. Wyd. The C.V. Mosby Company. St. Louis Washington, D.C. Toronto 1987.

[22] Balin A., Junak G.: Investigation of cyclic creep of surgical cements. Archives of Materials Science and Engineering 28, 5 (2007) 281-284.

[23] Lu Z., Mc Kellop H.: Effects of cement creep on stem subsidence and stresses in the cement mantle of a total hip replacement. Journal of Biomedical Materials Research 34 (1997) 221-226. [24] Verdonschot N., Huiskes R.: Mechanical Effects of Stem Cement Interface Characteristics in Total Hip Replacement. Clinical Orthopaedics and Related Research, 329 (1996) 326-336.

[25] Kolczyk E.: Trwałość cementu polimerowego do zastosowania w ortopedii. Praca doktorska (PhD Thesis). Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Materiałowej i Metalurgii, Katowice 2010.

[26] Balin A.: Badania nad zwiększeniem trwałości kompozytowych biomateriałów przeznaczonych dla ortopedii. Sprawozdanie z realizacji projektu badawczego (Report on research project) N N518 383837, 2009-2012.

[27] Balin A., Junak G., Sozańska M., Kolczyk E., Toborek J.: Wpływ domieszek na zachowanie się cementu chirurgicznego w warunkach obciążeń zmiennych. Engineering of Biomaterials 65-66 (2007) 8-10.

[28] Kolczyk E., Balin A., Sobczyk K.: Wpływ domieszki węgla szklistego na właściwości użytkowe polimerowego cementu. Aktualne Problemy Biomechaniki, Zeszyty Naukowe Katedry Mechaniki Stosowanej, z. nr 4, Gliwice (2010) 107-112.

[29] Kolczyk E., Balin A.: Zastosowanie modelu reologicznego do oceny wpływu domieszki węgla szklistego na cykliczne pełzanie cementu chirurgicznego. Aktualne Problemy Biomechaniki, Zeszyty Naukowe Katedry Mechaniki Stosowanej Zakładu Mechaniki Ogólnej i Biomechaniki, z. nr 3, Gliwice (2009) 99-104.

[30] Balin A., Junak G.: Low-cycle fatigue of surgical cements, Journal of Achievement in Materials and Manufacturing Engineering, 20, 1-2 (2007) 211-214.

[31] Śleziona J.: Podstawy technologii kompozytów. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1998.

[32] Rymuza Z.: Trybologia polimerów ślizgowych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 1986.

[33] Norma ISO 5833: Implants for surgery – Acrylic resin cements 2002 (E).

[34] Balin A.: Modelowe ujęcie wpływu warunków implantacji na kształtowanie właściwości kompozytów polimerowych stosowanych w ortopedii. Sprawozdanie z realizacji projektu badawczego (Report on research project) Nr 3 T08E 016 29, 2005-2008.

[35] Balin A., Ziemba S., Plaza M., Myalski J., Toborek J.: Examination of heat flow in a model of the biomechanical prosthesis-cementbone system. Zeszyty Naukowe Katedry Mechaniki Stosowanej, zeszyt nr 26, Biomechanika'06, Gliwice (2006) 29-34.

[36] Verdonschot N., Huiskes R.: Subsidence of THA stems due to acrylic cement creep is extremely sensitive to interface friction. J. Biomechanics, vol. 29, 12 (1996) 1569-1575.

[37] Balin A., Kolczyk E., Junak G.: The method of fatigue live estimation of the surgical cement. Biomechanics 2010, Book of abstracts (2010) 35-36.

[38] Hyla I.: Wybrane zagadnienia z inżynierii materiałów kompozytowych. PWN, Warszawa 1978.

[39] Pearce EI.: Metabolism in T cell activation and differentiation. Curr Opin Immunol. Jun; 22,3 (2010) 314-20. Epub 2010 Mar 29, 2010 Abstract.

[40] Brånemark R., Brånemark P-I, Rydevik B., Myers R.R.: Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation: a review Journal of Rehabilitation Research and Development 38, 2 (2001) 175-181.

[41] Kathy L. Elias, Rachel L. Price, Thomas J. Webster: Enhanced functions of osteoblasts on nanometerdiameter carbon fibers Biomaterials 23 (2002) 3279-3287.

[42] Collins M., Bassett J., Hai Bo Wen, Gervais Ch., Lomicka M., Papanicolaou S.: Trabecular Metal[™] Dental Implants: Overview of design and developmental research. 2011 Zimmer Dental Inc. 2096, Rev. 8/11 1-8.

[43] Hobkirk J.A.: Tissue reactions to implanted vitreous carbon and high purity sintered alumina. J Oral Rehabil. 4,4 (1977) 355-68.
[44] Kokot W., Iwaszkiewicz-Bilikiewicz B., Rozpłoch F., de Laval W.: Histopathological evaluation of orbital tissue encircling intraorbital implant made of glassy carbon and its influence on basic blood parameters in a rabbit. Klin Oczna 103, 2-3 (2001) 85-90.

[45] Balin A., Myalski J., Junak G., Chrapoński J., Sobczyk K.: The durability and adaptation proces of surgical cement modified with glassy carbon. Biomechanics 2012, Book of abstracts (2012) 29-30.

32

OCENA BIOLOGICZNA *IN VITRO* NOWYCH BIOMATERIAŁÓW STOMATOLOGICZNYCH

Zbigniew Jaegermann^{1*}, Lidia Ciołek¹, Ewa Zaczyńska², Anna Czarny²

¹ Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych, ul. Postępu 9, 02-676 Warszawa ² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław *e-mail: z.jaegermann@icimb.pl

Streszczenie

Ponieważ znane jest działanie bakteriobójcze srebra i złota, podjęto próbę wytworzenia nowej grupy biomateriałów bakteriobójczych do stosowania w stomatologii odtwórczej, zawierających cząstki nanosrebra i nanozłota. Celem opisanych badań była ocena cytotoksyczności i aktywności przeciwbakteryjnej nowo wytworzonych biomateriałów. Do ich przygotowania zastosowano roztwory koloidalne srebra i złota, a także dodatek bioszkieł zawierających nanosrebro. Badania oparto na cemencie szkło-jonomerowym zarabianym wodą. Jako bioszkieł zawierających nanosrebro użyto dwóch rodzajów szkieł otrzymanych metodą zol-żel.

Przeprowadzono badania podstawowych właściwości użytkowych wytworzonych cementów – czasu wiązania i wytrzymałości na ściskanie. Badania cytotoksyczności wykonano metodą bezpośredniego kontaktu zgodnie z normą ISO 10993-5. Badanie działania przeciwbakteryjnego przeprowadzono metodą rozcieńczeń z wykorzystaniem bakterii Pseudomonas aeruginosa oraz Staphylococcus aureus.

Wyniki powyższych prac wykazały, że zastosowana metoda dotowania srebrem lub złotem cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą pozwala na otrzymanie materiałów wykazujących działanie przeciwbakteryjne w stosunku do pałeczki ropy błękitnej Pseudomonas aeruginosa oraz gronkowca złocistego Staphylococcus aureus. Wśród cementów najlepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi charakteryzowały się cementy GJ-S2/W-P0-Ag i GJ-S2/W-Ag, nieco gorsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały materiały GJ-S2/W-Z8 i GJ-S2/W-Au, a najsłabsze - cement GJ-S2/W. Ponieważ badane materiały wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym po 48 i 72 godzinach inkubacji, dlatego w dalszych badaniach należy wyjaśnić przyczyny cytotoksyczności tych materiałów.

Chociaż otrzymane materiały wymagają udoskonalenia i optymalizacji, szczególnie w zakresie przygotowania proszków szkieł ze srebrem i właściwości użytkowych cementów, to otrzymane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych prac nad materiałami stomatologicznymi o działaniu przeciwbakteryjnym.

Słowa kluczowe: biomateriały, cementy stomatologiczne, cytotoksyczność, bakteriobójczość

[Inżynieria Biomateriałów 131 (2015) 32-39]

IN VITRO BIOLOGICAL EVALUATION OF NEW DENTAL BIOMATERIALS

Zbigniew Jaegermann^{1*}, Lidia Ciołek¹, Ewa Zaczyńska², Anna Czarny²

¹ DEPARTMENT OF CERAMIC TECHNOLOGY, INSTITUTE OF CERAMICS AND BUILDING MATERIALS, UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSAW, POLAND ² INSTITUTE OF IMMUNOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. RUDOLFA WEIGLA 12, 53-114 WROCLAW, POLAND *E-MAIL: Z.JAEGERMANN@ICIMB.PL

Abstract

Since the bactericidal effect of silver and gold is known, an attempt has been made to produce a new group of bactericidal biomaterials for use in restorative dentistry, containing nanoparticles of silver and gold. The aim of this research was to evaluate the cytotoxicity and antibacterial activity of newly produced biomaterials. Colloidal solutions of silver and gold, as well as the addition of nanosilver-containing bioglass were used for the preparation of these materials. The study was based on water-mixable glass-ionomer cement. Two types of glass, obtained by sol-gel method were used as nanosilver-containing bioglass.

The basic performance properties of produced cements - setting time and compressive strength were studied. Cytotoxicity assays were performed by a direct contact method, in accordance with ISO 10993-5 standard. The test of antimicrobial activity was performed using a dilution method, with Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus.

The results of the above work have shown that the method used to supplement water-mixable glassionomer cements with silver or gold allows to obtain materials with antibacterial properties against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Also, the addition of nanosilver and nanogold to cement did not cause significant changes in the level of cytotoxicity relative to the basic cement.

The resulting materials, however, require improvement and optimization, particularly regarding the preparation of glass powders with silver and performance of cements. The obtained results encourage the further study of dental materials with antibacterial properties.

Keywords: biomaterials, dental cements, cytotoxicity, bactericidal

[Engineering of Biomaterials 131 (2015) 32-39]

Wprowadzenie

Cementy szkło-jonomerowe są powszechnie stosowane w stomatologii zachowawczej i protetyce. Cechują się wysoką wytrzymałością mechaniczną, wysoką adhezją do szkliwa i zębiny, nie wykazują skurczu podczas wiązania, nie podlegają erozji w roztworze kwasu mlekowego ani w wodzie oraz uwalniają fluor w długim okresie czasu, przez co hamują rozwój próchnicy wtórnej. W trakcie twardnienia następuje ich chemiczne wiązanie z hydroksyapatytem zawartym w tkankach zębowych, co gwarantuje długotrwałość i szczelność wypełnienia [1]. Cementy szkło-jonomerowe wykazują także termiczną zgodność ze szkliwem i zębiną, ponieważ posiadają niski współczynnik rozszerzalności termicznej zbliżony do tkanek zęba. Poważnym problemem w stomatologii są choroby przyzębia. Jednym ze sposobów przeciwdziałania rozwojowi bakterii zawartych w płytce nazębnej może być stosowanie do wypełniania ubytków materiałów, które będą posiadały długotrwałą zdolność biobójczą.

Działanie przeciwbakteryjne srebra znane było już od wielu stuleci. Do dzisiaj zostało wyjaśnione i udokumentowane wiele aspektów i mechanizmów oddziaływania srebra na mikroorganizmy. W literaturze można znaleźć wiele wyników badań potwierdzających to, że srebro niszczy liczne rodzaje bakterii, grzybów i pleśni [2-5]. Terapia jonami srebra jest skuteczna w walce z takimi szczepami bakterii jak: pałeczki duru brzusznego, gronkowca złocistego, gonokoki czyli dwoinki Neissera, dwoinki zapalenia płuc czy paciorkowców. Szerokie spektrum właściwości antybakteryjnych jest szczególnie istotne przy kolonizacji florą mieszaną, która często jest związana z wszczepianiem biomateriałów [6]. Mechanizm leczniczego działania jonów srebra polega na tym, że oddziałują one na błonę komórkową mikrobów, uszkadzają ich RNA i DNA, co uniemożliwia odtwarzanie się cząsteczki DNA. Ponadto jony srebra blokują enzymy, które są pomocne w namnażaniu drobnoustrojów. Natomiast beztlenowe bakterie i wirusy są niszczone przez utlenianie [2]. Organizmy chorobotwórcze nie są zdolne do uodpornienia na jony srebra, dzieki czemu może ono wykazywać niezmienną skuteczność przez wiele lat. Nawet jeśli mechanizm niszczenia bakterii przez srebro nie został jeszcze do końca zaproponowany, to badania empiryczne ponad wszelką wątpliwość wykazały przydatność srebra do niszczenia drobnoustrojów. Znane są doniesienia literaturowe opisujące także inne działanie srebra, takie jak: silna stymulacja procesów gojenia skóry i innych tkanek miękkich, pobudzanie komórek kościotwórczych, a także leczenie najbardziej uciążliwych stanów zapalnych [6-8].

Od lat 70. XX wieku badano działanie przeciwbakteryjne makrocząstek srebra. Okazało się, że działanie biobójcze było skuteczne, lecz technologia produkcji zbyt droga. Dopiero dzieki opanowaniu sposobów otrzymywania srebra w postaci nanocząsteczek (nanosrebra) można było uzyskać wspaniałe relacje ceny do efektywności biobójczej i stosować nanosrebro na skalę masową, tym bardziej że jest to produkt ekologicznie czysty i bezpieczny dla otoczenia. Dodatkowo rozdrobnione nanocząsteczki mają ogromne rozwiniecie powierzchni czynnej, co bardzo podnosi potencjał biobójczy. Już stężenia roztworów 1÷200 ppm są skuteczne w codziennym użytku. Obecnie w medycynie niekonwencjonalnej srebro koloidalne jest używane jako doustne lekarstwo na różne dolegliwości, przede wszystkim z uwagi na jego właściwości przeciwbakteryjne i grzybobójcze. Z piśmiennictwa wynika, że właściwości przeciwbakteryjne nanocząstek Ag lub Au zależą nie tylko od stężenia nanocząstek w materiale, ale również od ich wielkości i kształtu [9,10].

Introduction

Glass-ionomer cements are widely used in conservative dentistry and prosthodontics. They are characterized by high mechanical strength, high adhesion to enamel and dentin, they do not show shrinkage during setting, do not erode in a solution of lactic acid or water and release fluoride over a long period of time, thereby hindering the development of caries. During the hardening process, the cements bind chemically to hydroxyapatite, present in dental tissues, which guarantees the durability and tightness of the filling [1]. Glass-ionomer cements also exhibit thermal compatibility with the enamel and dentin, because they have a low coefficient of thermal expansion, similar to the tooth tissue. A major problem in dentistry is periodontal diseases. One of the ways to prevent the development of dental plaque bacteria may be filling the cavities with materials having a long-term biocidal capacity.

The antibacterial activity of silver has been known for many centuries. To this day, many aspects and mechanisms of action of silver on microorganisms has been explained and documented. There are numerous reports in the literature, confirming that silver destroys many kinds of bacteria, fungi and moulds [2-5]. Silver ion therapy is effective in the fight against bacterial strains such as typhoid bacillus, Staphylococcus aureus, diplococci (Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhea, Diplococcus pneumoniae or Streptococcus pneumoniae). The broad spectrum of antibacterial properties is particularly important in the case of mixed bacterial flora colonization, which is often associated with the implantation of biomaterials [6]. The therapeutic mechanism of silver ions action is based on their interaction with microbial cell membrane, and damaging DNA and RNA, thus preventing DNA replication. Moreover, silver ions block the enzymes that are helpful during microbial growth. In contrast, anaerobic bacteria and viruses are destroyed by oxidation [2]. Silver resistance is not widespread among pathogens, for this reason, silver has constant effectiveness for many years. Even though the detailed mechanism of antibacterial action of silver is not yet fully accepted, the empirical studies have demonstrated beyond doubt the usefulness of silver for the destruction of microorganisms. There are also reports in the literature describing other effects of silver, such as a strong stimulation of the skin healing processes and other soft tissues, stimulation of osteoblasts, and healing of the acute inflammations [6-8].

Since 1970s the antibacterial properties of silver microparticles have been tested. It turned out, that the biocidal activity was effective, but the technology was too expensive. Only through the development of methods for the preparation of silver nanoparticles (nanosilver), a satisfactory relationship between the price and biocidal efficiency could have been established, allowing the use of nanosilver on a mass scale, especially since the product is ecologically clean and safe for the environment. In addition, the active surface of dispersed nanoparticles is significantly increased, which greatly enhances the biocidal potential. Solutions with a concentration of 1÷200 ppm are already effective in daily use. Currently, colloidal silver is used in alternative medicine as an oral remedy for various ailments, mainly because of its antibacterial and antifungal properties. The literature reports show that the antimicrobial properties of Ag or Au nanoparticles depend not only on the concentration of nanoparticles in a given material, but also on their size and shape [9,10].

Niektórzy autorzy uważają, że nanocząstki srebra czy złota
charakteryzują się pewnymi właściwościami katalitycznymi w niskich stężeniach, co może nawet ułatwiać wzrost bakterii [11].

Złoto, podobnie jak srebro, miedź i cynk również cechuje się zdolnościami biobójczymi i przeciwgrzybicznymi. W stomatologii roztwory koloidalne srebra i złota są stosowane do płukania kanałów korzeniowych w leczeniu endodontycznym.

Istotnym problemem w stomatologii są choroby przyzębia prowadzące w okresie późniejszym do tworzenia kieszonek, recesji dziąsła i utraty kości. Podstawowym czynnikiem etiologicznym większości tych chorób są bakterie pochodzące z płytki nazębnej. W zależności od zaawansowania choroby postępuje się w różnoraki sposób. W periodontologii zasadniczym celem terapeutycznym jest opanowanie infekcji bakteryjnej przez dążenie do obniżenia poziomu mikroorganizmów poprzez mechaniczne usunięcie płytki nazębnej. W agresywnej postaci choroby przyzębia stosuje się postępowanie dodatkowe w postaci antybiotykoterapii ogólnej lub miejscowej. Natomiast w najbardziej zaawansowanej chorobie przyzębia oprócz zlikwidowania przyczyny bakteryjnej zachodzi konieczność regeneracji tkanek kostnych wokół zęba głównie przy zastosowaniu metod chirurgicznych. Dlatego ważnym aspektem rozwiązywania problemów periodontologicznych jest działanie profilaktyczne, a jednym ze sposobów działania może być stosowanie w stomatologii zachowawczej materiałów, które będą posiadały długotrwałą zdolność bakteriobójczą.

Stąd celem prowadzonych badań było przygotowanie cementów szkło-jonomerowych poprzez zarobienie roztworami koloidalnymi srebra i złota lub przez dodanie do cementu proszku bioszkła zawierającego nanosrebro oraz ocena ich aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu z cementami zarobionymi wodą.

Materiały i metody

Badanie oparto na cemencie szkło-jonomerowym zarabianym wodą o symbolu GJ-S2/W (nr 8). Cement stanowi jednorodną mieszaninę proszków: szkła strontowobarowoglinokrzemianowego, poli(kwasu akrylowego), kwasu winowego i pigmentów barwiących. Jako bioszkieł zawierających nanosrebro użyto dwóch rodzajów szkieł otrzymanych metodą zol-żel o symbolach: P0-Ag i Z8. Zawartość srebra w bioszkłach wynosiła odpowiednio: 1% i 3,5%. Sposób przygotowania proszku cementu został opisany w pracy [12], a bioszkieł ze srebrem w [5,13].

Przygotowano dwa rodzaje cementów zawierających srebro i złoto: zarabiane roztworami koloidalnymi i z dodatkiem bioszkieł z nanosrebrem. Do przygotowania cementów zarabianych roztworami koloidalnymi (GJ-S2/W-Ag i GJ-S2/W-Au), użyto roztworów koloidalnych niejonowego srebra (stężenie 250 ppm, nr serii 2012.09.24A) i niejonowego złota (stężenie 200 ppm, nr serii 2013.05.06A) wyprodukowanych przez firmę Nano-Koloid Sp. z o. o. (www.nanogrp.com). Cementy z dodatkiem bioszkieł ze srebrem powstały przez dodatek proszków bioszkieł ze srebrem do proszku podstawowego w proporcji 2000:1 i zarobieniu ich wodą (GJ-S2/W-P0 i GJ-S2/W-Z8). Jako próbkę odniesienia przygotowano podstawowy cement zarabiany wodą destylowaną (GJ-S2/W). Zarówno cement GJ-S2/W jak i proszki bioszkieł ze srebrem P0-Ag i Z8 zostały opracowane i wytworzonego w Instytucie Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Some authors consider that the silver or gold nanoparticles have certain catalytic properties at low concentrations, which may even facilitate the growth of bacteria [11].

Gold, like silver, copper and zinc also has the biocidal and antifungal properties. In dentistry, colloidal solutions of silver and gold are used to wash the root canal during endodontic treatment.

Periodontal diseases constitute a significant problem in dentistry, leading subsequently to formation of pockets, gum recession and bone loss. Main etiological factor in majority of these diseases are bacteria from dental plaque. Therapeutic strategies vary depending on the severity of the disease. A primary therapeutic target in periodontics is the minimization of bacterial infection by reducing the number of microorganisms through the mechanical removal of plaque microflora. In an aggressive form of periodontal disease, additional procedures are used in the form of general or local antibiotic therapy. However, during the most advanced stages of periodontal disease, in addition to elimination of the bacterial culprit, it is necessary to regenerate bone tissue around the tooth, mainly using surgical methods. Therefore, an important aspect of problem solving is periodontal prophylactic, and one of the courses of action may be the use of materials with long-lasting bactericidal capacity in conservative dentistry.

Hence, the purpose of the study was to prepare the glass-ionomer cements by mixing it with colloidal solutions of silver and gold, or by adding a nanosilver-containing bioglass powder to the cement, and evaluation of their antimicrobial activity compared with cements mixed with water.

Materials and Methods

The study was based on water-mixable glass-ionomer cement GJ-S2/W (nr 8). Cement is a homogeneous mixture of powders: strontium-barium-aluminosilicate glass, polyacrylic acid, tartaric acid and the coloring pigment. Two types of glass (symbols: P0-Ag and Z8), obtained by a solgel method, were used as a nanosilver-containing bioglass. The concentration of silver in bioglass was 1% and 3.5%, respectively. A method of preparing the cement powder has been described in [12], and bioglass with silver in [5,13].

Two types of cements containing silver and gold were prepared: mixed with colloidal solutions and with the addition of nanosilver-containing bioglass. Colloidal solutions of non-ionic silver (concentration 250 ppm, batch no. 2012.09.24A) and non-ionic gold (200 ppm concentration, batch no. 2013.05.06A) produced by Nano-Koloid Sp. z o. o. (www.nanogrp.com) were used to prepare cements mixed with colloidal solutions (GJ-S2/W-Ag and GJ-S2/W-Au). Cements with the addition of nanosilver-containing bioglass were prepared by the addition of nanosilver-containing bioglass powder to the base powder in a ratio of 2000:1 and mixing with water (GJ-S2/W-P0 and GJ-S2/W-Z8). Basic cement mixed with distilled water (GJ-S2/W) was prepared as a reference sample. Both the GJ-S2/W cement and the nanosilver-containing bioglass powder, P0-Ag and Z8, have been developed and prepared at the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw.

Each cement sample was prepared in the same manner. A weighed quantity of powder, divided into two equal parts, and the appropriate amount of the mixing liquid were placed on a glass plate. The weight ratio of powder to liquid was 2.7:0.4. Half of the powder was added to the total amount of liquid and mixed for 10 seconds. Then the remaining powder was added and mixed for the next 10 seconds, until a homogeneous mass was obtained. All test samples were formed from cement prepared according to this method.

Każdą próbkę cementu przygotowano w taki sam sposób. Na płytce szklanej umieszczono odważoną ilość proszku podzieloną na dwie równe części oraz odpowiednią ilość płynu do zarabiania. Stosunek wagowy proszku do płynu wynosił 2,7:0,4. Do całej ilości płynu wprowadzono połowę proszku i mieszano przez 10 sekund. Następnie dodano pozostały proszek i mieszano do uzyskania jednolitej masy przez następne 10 sekund. Z tak przygotowanego cementu formowano wszystkie próbki do badań.

Czas wiązania cementów określano w temperaturze 37°C przy pomocy penetrometru o masie 400 g ± 5 g zakończonego igłą z płaską końcówką o średnicy 1 mm. Po napełnieniu formy materiałem w stanie plastycznym przeprowadzano badanie poprzez opuszczanie końcówki penetrometru pionowo na jego powierzchnię i pozostawienie jej przez 5 s. Igłę penetrometru opuszczano w odstępach dziesięciosekundowych, aż do momentu, gdy igła przestała pozostawiać w materiale koliste wgłębienia widoczne przy dwukrotnym powiększeniu. Za czas wiązania przyjęto czas jaki upłynął od końca mieszania do momentu, gdy igła nie pozostawia kolistych śladów na powierzchni cementu.

Oznaczono wartości wytrzymałości na ściskanie opracowanych cementów, gdyż parametr ten określa odporność materiałów stosowanych do odbudowy twardych tkanek zęba na działanie pionowych sił podczas czynności żucia. Dla każdego cementu przygotowano po 6 próbek w kształcie walców. Zaraz po zakończeniu mieszania, badanymi cementami wypełniano formy ze stali nierdzewnej, aby otrzymać próbki o średnicy 4 mm i wysokości 6 mm. Po upływie 1 godziny próbki szlifowano, wyjmowano z form, zanurzano w wodzie i przechowywano przez 24 godziny w cieplarce utrzymującej temperaturę 37°C. Parametry wytrzymałościowe otrzymanych cementów określono z wykorzystaniem maszyny wytrzymałościowej, o maksymalnym obciążeniu 10 kN i szybkości posuwu głowicy 0,7 mm/min. Wartości wytrzymałości na ściskanie obliczane były przez program komputerowy na podstawie wprowadzonych wymiarów próbek i zmierzonego obciążenia maksymalnego.

Badania działania cytotoksycznego wykonano zgodnie z Polska Normą (PN-EN ISO 10993-5:2009). Hodowlę komórek L929 (linia komórek fibroblastopodobnych otrzymanych z podskórnej tkanki tłuszczowej myszy C3H) prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Komórki pasażowano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie cytotoksycznego działania próbek wykonano metodą bezpośredniego kontaktu z jednowarstwową hodowlą komórek L929 po 24, 48 oraz 72 godzinach. Na płytce 24-dołkowej firmy Nunc zakładano hodowlę komórek L929 o gęstości 1x105/ml i inkubowano 24 h w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Po tym czasie płyn znad komórek usunięto, a jednowarstwową hodowlę komórek zalano 1 ml płynu hodowlanego z dodatkiem 2% surowicy cielęcej. Na tak przygotowaną hodowlę komórek nałożono próbki badanych materiałów w postaci krążków i inkubowano w temperaturze 37°C i atmosferze 5% CO2. Przed nałożeniem na komórki, próbki materiałów naświetlono promieniami UV przez 45 min. Zmiany ilościowe i morfologiczne, pod wpływem badanych materiałów, oceniono po 24, 48 i 72 godzinach w mikroskopie odwróconym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Martwe komórki wybarwione są na granatowo, a żywe, opalizujące - są bezbarwne.

The setting time of cement was determined at 37° C, using a penetrometer with a mass of 400 g + 5 g and a 1 mm -diameter flat tip. After filling the mold with material in a plastic state, the test was performed by lowering the tip of the penetrometer vertically on the material surface and leaving it there for 5 seconds. The penetrometer tip was lowered at intervals of ten seconds, until it was no longer leaving the circular indentations in the material, visible under 2x magnification. The setting time was the elapsed time from the end of mixing, until the tip was no longer leaving the circular indentations on the cement surface.

The compressive strength values of the developed cements has been established, since this parameter determines the resistance of materials used for the reconstruction of hard tissues of the tooth, against the vertical forces exerted during chewing action. Six cylindrical samples were prepared for each cement type. Immediately after mixing, a stainless steel molds were filled with the tested cements to obtain samples with a diameter of 4 mm and a height of 6 mm. After 1 h the samples were polished, removed from the molds, immersed in water and stored for 24 h in an incubator set at 37°C. Strength parameters of prepared cements were determined using a testing machine, with a maximum load of 10 kN and the speed of head traverse of 0.7 mm/min. Compression strength values were calculated by a computer program, based on a given sample dimensions and the measured maximum load.

The cytotoxicity of biomaterials was investigated according to Polish standard (PN-EN ISO 10993-5:2009) on mouse fibroblasts line L929 (American Type Culture Collection Certified Cell Line-ATCC CCL1). The culture cells were maintained in Eagle's medium (EMEM-minimum essential medium Eagle'a) supplemented with 10% calf serum, antibiotics (100 U/mL penicillin and 100 g/mL streptomycin), and 2 mM I-glutamine. The cells were passaged using 0.05% trypsin with 0.02% EDTA in PBS, pH 7.2. Testing of the cytotoxic effect of the samples was performed by direct contact with a monolayer of L929 cells after 24, 48 and 72 h. A culture of L929 cells with a density of 1x10⁵/ml has been carried out on a 24-well Nunc plate, and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂. After this time the cell culture supernatant was removed and the 1 ml of medium supplemented with 2% calf serum was added to cell monolayer. Samples of the tested materials in the form of discs were applied on such prepared cell culture and incubated at 37°C and 5% CO₂. Before applying material on the cells, the samples were irradiated with UV light for 45 min. Morphological and quantitative changes resulting from the application of tested materials were evaluated after 24, 48 and 72 h using an inverted microscope. In order to determine the amount of dead cells, staining with trypan blue was used. Dead cells are stained dark blue, while viable cells are iridescent and colorless.

Antimicrobial activity studies were conducted using microorganisms from the Polish Collection of Microorganisms (PCM): Pseudomonas aeruginosa (PCM 2058) and Staphylococcus aureus (PCM 2054). The dilution method was used during the study. The starting bacterial cultures of the test strains of P. aeruginosa and S. aureus, were set up in nutrient broth and incubated for 18 h at 37°C. Cement samples for testing were sterilized by UV irradiation for 45 min. 100 µl of bacterial culture was added to wells on a sterile 24-well plastic plate (NUNC), containing 1 ml of broth and the test material (disc) and incubated for 24 h, 48 h and 7 days. After this time the cultures were diluted with NaCl and 100 µl was plated on nutrient agar plates. The plates were incubated at 37 ± 1°C. After 18 h of incubation, colonies were counted. Broth cultures of all microorganisms, without the tested materials were used as controls.

Badania działania przeciwbakteryjnego przeprowadzono z wykorzystaniem mikroorganizmów pochodzących z Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM): Pseudomonas aeruginosa - pałeczka ropy błękitnej (PCM 2058) oraz Staphylococcus aureus - gronkowiec złocisty (PCM 2054). W badaniach zastosowano metodę rozcieńczeń. Wyjściowe hodowle szczepów testowych bakteryjnych, P. aeruginosa i S. aureus, założono w bulionie odżywczym i inkubowano 18 godzin w temperaturze 37°C. Próbki cementów do badań sterylizowano przez naświetlanie promieniami UV przez 45 min. Do studzienek, na sterylnej 24 dołkowej płytce plastikowej (NUNC), zawierających 1 ml bulionu i badany materiał (krążek), dodawano po 100 µl hodowli bakteryjnej i inkubowano 24 h, 48 h oraz 7 dni. Po tym czasie hodowle rozcieńczano NaCl i wysiewano po 100 µl na płytki z agarem odżywczym. Płytki inkubowano w temperaturze 37±1°C. Po 18 godzinach inkubacji liczono kolonie. Kontrole stanowiły hodowle bulionowe poszczególnych mikroorganizmów,

Zarówno badania działania cytotoksycznego jak i przeciwbakteryjnego wykonano w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

Wyniki i dyskusja

bez testowanych materiałów.

Wyniki badania czasu wiązania cementów wykazały, że zarabianie cementów roztworami koloidalnymi nie wpływa na zmianę czasu wiązania, natomiast dodatek bioszkieł ze srebrem wydłuża czas wiązania o ok. 40-45% (RYS. 1). Badania wytrzymałości na ściskanie (RYS. 2) nie wykazały istotnego wpływu roztworu do zarabiania cementów na ten parametr. Dodatek bioszkieł z nanosrebrem w niewielkim stopniu obniża wytrzymałość cementów na ściskanie.

Aby określić stopień cytotoksyczności badanych cementów określono wzrost komórek, ich żywotność i zmiany morfologiczne. Po 48 i 72 godzinach inkubacji wszystkie rodzaje cementów wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym (TABELA 1).

TABELA 1. Zmiany cytotoksyczności w hodowli komórek L929 pod wpływem badanych próbek cementów.

TABLE 1. Changes of cytotoxicity in L929 cell culture after exposure to the tested cement samples.

Questo	Stopień cytotoksyczności* The degree of cytotoxicity*		
próbki Cement symbol	po 24 godz. inkubacji after 24 h of incubation	po 48 godz. inkubacji after 48 h of incubation	po 72 godz. inkubacji after 72 h of incubation
GJ-S2/W	1	2	2
GJ-S2/W-Ag	0	2	2
GJ-S2/W-Au	0	1	1
GJ-S2/W-P0-Ag	2	1	2
GJ-S2/W-Z8	1	2	2
* 0 - brak, 1 - słaby, 2 - umiarkowany			

0 - no effect, 1 - weak effect, 2 - moderate effect

Both the studies of cytotoxic activity and antibacterial properties were conducted at the Institute of Immunology and Experimental Therapy PAS, in Wroclaw.

Results and Discussion

The results of the cement setting time testing showed that the mixing of cements with colloidal solutions does not change the setting time, while the addition of silver-containing bioglass increases the setting time by approx. 40-45% (FIG. 1). Compressive strength tests (FIG. 2) showed no significant effect of a cement mixing solution on this parameter. The addition of nanosilver-containing bioglass slightly reduces the compressive strength of the cements.

To determine whether cements may affect cells, new biomaterials were assayed for in vitro cytotoxic activities, in the standardized cell-culture system, according to Polish standard (PNEN ISO 10993-5:2009) where mouse fibroblasts cell line L929 were used. Cell growth, cell morphology and cell viability were examined as the parameters to determine the cytotoxicity of the cements. After 48 and 72 h of incubation, all of the tested cements displayed cytotoxicity to low or moderate degree (TABLE 1).



RYS. 1. Czasy wiązania badanych próbek cementów (badanie reprezentatywne). FIG. 1. The setting times of tested cement samples (representative experiment).



RYS. 2. Wytrzymałość na ściskanie badanych próbek cementów (wartości średnie z odchyleniem standardowym).

FIG. 2. Compressive strength of the cement test samples (average values with standard deviation).

Po 24 h jedynie cementy zarabiane roztworami koloidalnymi (GJ-S2/W-Ag i GJ-S2/W-Au) nie wykazywały działania cytotoksycznego. Badania wykazały, że dodatek nanosrebra do cementów nie spowodował istotnych zmian stopnia cytotoksyczności w stosunku do cementu podstawowego (GJ-S2/W). Najniższym stopniem cytotoksyczności charakteryzował się cement z dodatkiem nanocząstek złota.

Przykładowe obrazy mikroskopowe morfologii komórek (po 72 godz. inkubacji) zamieszczono na RYS. 3.

After 24 h only cements mixed with colloidal solutions (GJ-S2/W-Ag and GJ-S2/W-Au) showed no cytotoxic effect. Studies have shown that addition of nanosilver to cement did not cause significant changes in the level of cytotoxicity, comparing to the base cement (GJ-S2/W). The lowest degree of cytotoxicity was displayed by the cement with the addition of gold nanoparticles.

Representative microscopic images of the cells morphology (after 72 h of incubation) are presented in FIG. 3.



RYS. 3. Zmiany morfologii komórek po 72 godzinach inkubacji z wybranymi cementami w porównaniu z kontrolną hodowlą komórek L929 bez cementów. FIG. 3. The morphological changes in cells cultures L929 in the presence of selected cements in comparison to control cells cultures without this cements.

Badania działania przeciwbakteryjnego wykazały, że cementy zawierające nanocząstki srebra i złota w porównaniu do materiału bez dodatków (GJ-S2/W) wykazują słabe działanie przeciwbakteryjne – kilkukrotnie obniżają ilość bakterii. Spośród tych cementów najlepszym działaniem charakteryzuje się cement zarabiany roztworem koloidalnym srebra (GJ-S2/W Ag), natomiast najsłabszym - cement z dodatkiem bioszkła Z8 (GJ-S2/W-Z8). Natomiast w porównaniu do kontrolnych hodowli szczepów, wszystkie cementy z Ag lub Au bardzo wyraźnie wpływają na obniżenie liczby bakterii (blisko 100x) (RYS. 4 i 5). The studies of antibacterial activity have shown that cements containing silver and gold nanoparticles, compared to a material without additives (GJ-S2/W), exhibit weak antibacterial activity - reducing the amount of bacteria several-fold. From among these cements, the most effective is cement mixed with colloidal solution of silver (GJ-S2/W Ag), while the weakest - cement with the addition of Z8 bioglass (GJ-S2/W-Z8). However, in comparison to control cultures of bacterial strains, all cements containing Ag or Au very clearly contribute to decreasing the number of bacteria (approx. 100x) (FIG. 4 and 5).



Podsumowanie

38

Ponieważ prowadzone badania miały charakter wstępny, prezentowane wnioski są ogólne i muszą zostać zweryfikowane w toku dalszych, szczegółowych badań. Wyniki powyższych prac wykazały, że zastosowana metoda dotowania srebrem lub złotem cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą pozwala na otrzymanie materiałów wykazujących działanie przeciwbakteryjne w stosunku do pałeczki ropy błękitnej Pseudomonas aeruginosa oraz gronkowca złocistego Staphylococcus aureus. Wśród cementów najlepszymi właściwościami przeciwbakteryjnymi charakteryzowały się cementy GJ-S2/W-P0-Ag i GJ-S2/W-Ag, nieco gorsze działanie przeciwbakteryjne wykazywały materiały GJ-S2/W-Z8 i GJ-S2/W-Au, a najsłabsze - cement GJ-S2/W. Ponieważ badane materiały wykazywały cytotoksyczność w stopniu słabym lub umiarkowanym, po 48 i 72 godzinach inkubacji, dlatego w dalszych badaniach należy wyjaśnić jej przyczyny. Otrzymane materiały wymagają jednak udoskonalenia i optymalizacji, szczególnie w zakresie przygotowania proszków szkieł ze srebrem i właściwości użytkowych cementów. Otrzymane wyniki zachęcają do prowadzenia dalszych prac nad materiałami stomatologicznymi o działaniu przeciwbakteryjnym.

Podziękowania

ш 🗰

Praca została sfinansowana ze środków na działalność statutową Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie.

Conclusions

Since the conducted studies have a preliminary character, presented conclusions are general and must be verified in the course of further detailed studies. The results of the above work have shown that the method used to supplement water-mixable glass-ionomer cements with silver or gold allows to obtain materials with antibacterial properties against Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Cements GJ-S2/W-P0-Ag and GJ-S2/W-Ag displayed the strongest antibacterial properties, slightly weaker antibacterial effects were displayed by materials GJ-S2/ W-Z8 and GJ-S2/W-Au, and the weakest - by cement GJ-S2/W. Since the tested materials displayed weak to moderate degree of cytotoxicity after 48 and 72 h of incubation, it is necessary to explain the cytotoxicity of these materials in the course of future research. The resulting materials, however, require improvement and optimization, particularly regarding the preparation of glass powders with silver and performance of cements. The results encourage to conduct further studies on dental materials with antibacterial properties.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Institute of Ceramics and Building Materials in Warsaw for providing financial support to this project.

Pismiennictwo

[1] Karaś J.: Materiały stosowane do odbudowy twardych tkanek zębowych - część I. Szkło i Ceramika 57(4) (2006) 9-13.

[2] Di Nunzio S. Miola M., Vernè E., Massè A., Maina G., Fucale G.: Antibacterial behaviour of a silver-doped glass for bone surgery. European Cells and Materials 10(1) (2005) 22.

[3] Kim T.N. Feng Q.L., Kim J.O., Wu J., Wang H., Chen G.C., Cui F.Z.: Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Zn²⁺ i Cu²⁺). Journal of Materials Science: Materials in Medicine 9(3) (1998) 129-134.

[4] Iroha I.R., Amadi E.S., Orji J.O., Esimone C.O.: In vitro evaluation of the activity of colloidal silver concentrate against Pseudomonas aeruginosa isolated from postoperative wound infection. Scientific Research and Essay 3(5) (2008) 209-211.
[5] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A.: Badanie właściwości fizyko-

[5] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A.: Badanie właściwości fizykochemicznych bioszkieł domieszkowanych srebrem wytworzonych metodą zol-żel. Prace ISCMOiB, 3 (2009) 13-25.

[6] Blaker J.J., Nazhatb S.N., Boccaccini A.R.: Development and characterization of silver-doped bioactive glass-coated surfaces for tissue engineering and wound healing applications. Biomaterials 25(7-8) (2004) 1319-1329.

[7] Salvin H.: Ionic silver – the powerful defense against viruses and other microbes. Health Freedom News 24(3) (2006) 1-7.

[8] Clupper D.C., Hench L.L.: Bioactive response of Ag-doped tape cast Bioglass® 45S5 following heat treatment. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 12(10-12) (2001) 917-921.

[9] Pal S, Tak YK, Song JM: Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 73, (2007) 1712-1720.

[10] Mahendra Raii et al.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances 27 (2009) 76-83.

[11] Rehab MA et al.: Rapid and sensitive microplate assay for screening the effect of silver and gold nanoparticles on bacteria. Nanomedicine 4 (2009) 637-643.

[12] Karaś J., Ciołek L., Michałowski S.: Badania nad syntezą stomatologicznych cementów szkło-jonomerowych zarabianych wodą. Szkło i Ceramika 55(5) (2004) 28-32.

[13] Ciołek L., Karaś J., Olszyna A, Zaczyńska E., Czarny A., Żywicka B.: Badania działania bakteriobójczego in vitro w funkcji czasu bioszkieł z układu SiO₂ - Al₂O₃ dotowanych srebrem. Szkło i Ceramika 61(5) (2010) 34-38.

• • • • • • • • • • • • • • • •

References



STUDIA PODYPLOMOWE Biomateriały – Materiały dla Medycyny 2015/2016

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów Kierownik: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła Sekretarz: Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 210 tel. 12 617 44 48, 12 617 47 44, fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/ studia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny/	
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląc metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i ko towania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwośc zykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa troskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne z (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowsz medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	d wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: mpozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projek- ciami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fi- mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spek- i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi ymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków,	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodni- czych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla me- dycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią anali- zować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.		
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2015 do 20.10.2015 (liczba miejs Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 47 44, e-mail	c ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) epamula@agh.edu.pl) : krok@agh.edu.pl)	

Czas trwania: 2 semestry (160 h) 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu Przewidywana data rozpoczęcia: 28.11.2015	Opłaty: 2 600 zł

•••••