

**PUBLISHER:** WYDAWCA:

Polish Society for Biomaterials in Cracow Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

EDITORIAL COMMITTEE: KOMITET REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief Redaktor naczelny Jan Chłopek

Secretary of editorial Sekretarz redakcji Katarzyna Trała

Design Projekt Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

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

Issue: 200 copies Nakład: 200 egz.

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



# INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac University Politehnica of Bucharest, Romania

LUCIC BACAKOVA Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Romuald Będziński Politechnika Wrocławska / Wrocław University of Technology

Marta Błażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Stanisław Błażewicz Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Maria Borczuch-Łączka Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

TADEUSZ CIEŚLIK Śląski Uniwersytet Medyczny / Medical University of Silesia

Jan Ryszard Dąbrowski Politechnika Białostocka / Białystok Technical University

Andrzej Górecki Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw

Robert Hurt Brown University, Providence, USA

James Kirkpatrick Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

WOJCIECH MATIA KUŚ Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw

Małgorzata Lewandowska-Szumieł Akademia Medyczna w Warszawie / Medical University of Warsaw

Jan Marciniak Politechnika Śląska / Silesian University of Technology

Sergey Mikhalovsky University of Brighton, Great Britain

Stanisław Mitura Politechnika Łódzka / Technical University of Lodz

Roman Pampuch Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Cracow

Stanisław Pielka Akademia Medyczna we Wrocławiu / Wrocław Medical University

Jacek Składzień Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Kraków/UJ, Collegium Medicum, Cracow

ANNA Ś**łósarczyk** Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków / AGH University of Science and Technology, Gracow

TADEUSZ TRZASKA AWF, Poznań / University School of Physical Education, Poznań

Dimitris Tsipas Aristotle University of Thessaloniki, Greece

# ENGINEERING OF 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\*.

(\*Prace nierecenzowane, w tym materiały konferencyjne, będą drukowane w numerach specjalnych pod koniec roku kalendarzowego.)

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres redakcji na płytach CD wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

4. Struktura artykułu:

• TYTUŁ • Autorzy • Streszczenie (100-200 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziekowania • Piśmiennictwo

5. Materiały ilustracyjne powinny znajdować się poza tekstem w oddzielnych plikach. Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarnobiałe 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. W dodatkowym dokumencie należy zamieścić spis tabel i rysunków (po polsku i angielsku).

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 recenzenta 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, 617 22 38 tel./fax: (48 12) 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl www.biomat.krakow.pl

# Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48 12) 617 45 41

Konto:

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 Bank Śląski S.A. O/Kraków, nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001 Opłaty: Cena 1 numeru wynosi 20 PLN

# Instructions for authors

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

2. All articles are reviewed\*.

(\* Non-reviewed articles, including conference materials, will be printed in special issues at the end of the year.)

3. Manuscripts should be submitted to Editor's Office on CD with a printout, drawings and photos.

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

TITLE • Authors and affiliations • Abstract (100-200 words)

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

5. Authors' full names and affiliations with postal addresses should be given. If authors have different affiliations use superscripts 1,2...

6. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be presented in separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp) and not incorporated into the Word document. High-resolution 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.

7. 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.

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 magazine.

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

10. Papers will not be considered for publication until all the requirements will be fulfilled.

11. Manuscripts should be submitted for publication to:

## Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics 30/A-3, Mickiewicza Avenue, 30-059 Cracow, Poland

tel. (48 12) 617 25 03, 617 22 38 tel./fax: (48 12) 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, apowroz@agh.edu.pl 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 Avenue 30-059 Cracow, Poland Bank Slaski S.A. O/Krakow account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001



# **SPIS TREŚCI**

# CONTENTS

**COMPARATIVE EPR ANALYSIS OF OXYGEN COMPARATIVE EPR ANALYSIS OF OXYGEN** INTERACTIONS WITH PLANTS CARBONIZED INTERACTIONS WITH PLANTS CARBONIZED 1 1 AT DIFFERENT TEMPERATURES AT DIFFERENT TEMPERATURES S. BARTŁOMIEJCZYK, B. PILAWA, M. KRZESIŃSKA, S. PUSZ, S. BARTŁOMIEJCZYK, B. PILAWA, M. KRZESIŃSKA, S. PUSZ, J. ZACHARIASZ, W. WAŁACH J. ZACHARIASZ, W. WAŁACH CONDITIONS OF PHOTODYNAMIC THERAPY CONDITIONS OF PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMOR CELLS EXAMINED BY CARBONIZED OF TUMOR CELLS EXAMINED BY CARBONIZED 4 COAL AND EPR SPECTROSCOPY Δ COAL AND EPR SPECTROSCOPY M. LATOCHA, B. PILAWA, R. PIETRZAK, P. NOWICKI, M. LATOCHA, B. PILAWA, R. PIETRZAK, P. NOWICKI, H. WACHOWSKA H. WACHOWSKA INFLUENCE OF OXYGEN O2 ON MICROWAVE INFLUENCE OF OXYGEN O<sub>2</sub> ON MICROWAVE SATURATION OF EPR LINES OF PLANTS SATURATION OF EPR LINES OF PLANTS **CARBONIZED AT 650°C AND POTENTIAL** CARBONIZED AT 650°C AND POTENTIAL **APPLICATION IN MEDICINE** 7 7 **APPLICATION IN MEDICINE** B. PILAWA, S. BARTŁOMIEJCZYK, M. KRZESIŃSKA, S. PUSZ, B. PILAWA, S. BARTŁOMIEJCZYK, M. KRZESIŃSKA, S. PUSZ, J. ZACHARIASZ, W. WAŁACH J. ZACHARIASZ, W. WAŁACH WŁAŚCIWOŚCI DRUTÓW STOSOWANYCH **PROPERTIES OF WIRE USED** 10 10 W ZABIEGU NEFROSTOMII IN NEPHROSTOMY A. SOŁTYSEK, J. PRZONDZIONO, J. SZALA, J. KAWECKI A. SOŁTYSEK, J. PRZONDZIONO, J. SZALA, J. KAWECKI **BIOCERAMICZNE WARSTWY KOMPOZYTOWE BIO-CERAMIC COMPOSITE LAYERS** WYTWARZANE METODĄ HYBRYDOWĄ **ON TIGAI4V ALLOY PRODUCED** 13 13 **NA STOPIE Ti6AI4V BY HYBRID METHOD** B. SUROWSKA, J. BIENIAŚ, T. WIERZCHOŃ, M. OSSOWSKI, B. SUROWSKA, J. BIENIAŚ, T. WIERZCHOŃ, M. OSSOWSKI, M. ROKITA M. ROKITA

Streszczane w Applied Mechanics Reviews Abstracted in Applied Mechanics Reviews Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego Edition financed by the Minister of Science and Higher Education

BIOSZKŁO NOWEJ GENERACJI JAKO SKŁADNIK KOMPOZYTU Z HYDROKSYAPATYTEM	16	NEW GENERATION BIOGLASS AS A COMPONENT OF HYDROXYAPATITE COMPOSITE	16
J. Kokoszka, A. Onyszkiewicz, K. Szymańska, K.J. Bramowska, K. Cholewa-Kowalska, A. Śl M. Łączka	ÓSARCZYK,	J. Kokoszka, A. Onyszkiewicz, K. Szymańska, K.J. Bramowska, K. Cholewa-Kowalska, A. Ślósarcz M. Łączka	ZYK,
WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE LITYCH WS CEMENTU WAPNIOWOFOSFORANOWEGC Z DODATKIEM ALGINIANU SODU. PORÓW BADANIA EKSPERYMENTALNE	zczepów ) /nawcze 19	BIOLOGICAL PROPERTIES OF SOLID CALCIUM PHOSPHATE CEMENT IMPLANTS WITH ADDITION OF SODIUM ALGINATE. EXPERIMENTAL COMPARATIVE STUDIES	19
S. Pielka, J. Karaś, B. Żywicka, D. Paluch, S. Traczyk, W. Berendt, L. Solski		S. Pielka, J. Karaś, B. Żywicka, D. Paluch, S. Traczyk, W. Berendt, L. Solski	
WARTOŚĆ BIOLOGICZNA WSZCZEPÓW CEMENTU WAPNIOWO-FOSFORANOWEG APLIKOWANYCH INIEKCYJNIE DO UBYTK KOŚCI, W BADANIACH EKSPERYMENTALI	о, ów NYCH <b>24</b>	EXPERIMENTAL STUDIES OF BIOLOGICAL EVALUATION OF CALCIUM PHOSPHATE CEMENT IMPLANTS INJECTED TO BONE TISSUE	24
S. PIELKA, J. KARAS, B. ŻYWICKA, D. PALLICH, S.	TRACZYK	S PIELKA J KARAS B ŻYWICKA D PALLICH S TRACZ	VK

W. BERENDT, L. SOLSKI

W. BERENDT, L. SOLSKI

BI MATERIALS

|| • • • •

# COMPARATIVE EPR ANALYSIS OF OXYGEN INTERACTIONS WITH PLANTS CARBONIZED AT DIFFERENT TEMPERATURES

Sylwia Bartłomiejczyk, Barbara Pilawa\*, Marta Krzesińska, Sławomira Pusz, Justyna Zachariasz, Wojciech Wałach

Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Science, Marii Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze, Poland \*e-mail: bpilawa@karboch.gliwice.pl

## Abstract

Carbon materials, bamboo (Bambusa vulagris) and yucca (Yucca flaccida) pyrolysed at 550°C, 750°C and 950°C, were tested as oximetric probes by electron paramagnetic resonance spectroscopy at X-band (9.3 GHz). The following parameters of the spectra: amplitude, linewidth and g-factor, were determined. Influence of oxygen molecules O<sub>2</sub> on EPR spectra of the individual carbon materials was compared. Strong EPR spectra were recorded for samples carbonized at 550°C and weak signals were obtained for plants carbonized at higher temperatures: 750°C and 950°C. It was stated that amplitudes of EPR lines of all the carbonized plants decrease in the air environment compared to amplitudes of spectra measured in vacuum. This effect increases with degree of vacuum. Changes in the EPR spectra of samples studied in the air environment may be applied in medicine to determination of oxygen content in different cells. Because of strong resonance signals as oximetric probes we proposed bamboo and vucca carbonized at 550°C, and we rejected plants carbonized at 750°C and 950°C with low EPR signals.

Keywords: carbonized plants, paramagnetic centers, paramagnetic oxygen molecules, electron paramagnetic resonance, EPR spectra, oximetry [Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 1-3]

# Introduction

Paramagnetism of carbon materials depends on temperature of sample heating [1-11]. High concentration of paramagnetic centers and chemical structure indicate susceptibility of materials to oxygen. Carbon materials may be used as oximetric probes for biological systems [12-18]. Oximetry is a very important technique for determination of singlet oxygen formation during photodynamic therapy [19-20]. Photodynamic therapy of tumor cells is accompanied by intensive excitation of oxygen molecules to singlet state by laser irradiation. Singlet oxygen formation in cells is accompanied by decrease of amplitude of EPR lines of carbon probe [16-18]. New carbon oximetric probes are still searching and their chemical structure is studied.

The aim of this work was to find carbon materials for EPR spectroscopic oximetry in medicine. Carbon materials obtained from different types of pyrolysed plants were tested by the use of electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. The best oximetric probes characterize strong dependence of EPR spectra on oxygen contents in the environment. We compared interactions of paramagnetic centers of the individual samples with paramagnetic oxygen molecules  $O_2$ .

# Materials and methods

Bamboo (Bambusa vulagris) and yucca (Yucca flaccida) pyrolysed at 550°C, 750°C, and 950°C were studied. Carbonization process was done in the neutral atmosphere.

The first derivative EPR spectra were measured with magnetic modulation of 100 kHz. The measurements were done by the use of RADIOPAN (Poznań, Poland) EPR spectrometer with microwave frequency of 9.3 GHz. Microwave frequency was detected by MCM102 recorder produced by EPRAD Firm (Poznań, Poland). Amplitudes (A), linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) and g-factors of the EPR lines were obtained. EPR spectra were measured with different attenuations [dB]: 15, 10, 5, and 0.5. EPR measurements were done for samples in air and in vacuum (900-10<sup>-5</sup> mbar).

# **Results and discussions**

No EPR lines were measured for the original plant samples. Probably low amount of paramagnetic centers exist in bamboo and yucca, but their concentration is negligible. During heating of plant materials chemical bonds are ruptured and paramagnetic centers appear in the samples. EPR spectra were obtained for all the studied carbonized materials. g-Values were in the range 2.0028-2.0030. Paramagnetic centers concentrations in the carbonized plants were about 10<sup>16</sup>-10<sup>21</sup> spin/g.



FIG.1. EPR spectra of bamboo carbonized at 550°C (a) and 750°C (b). Data for samples in air.



FIG.2. EPR spectra of yucca carbonized at 550°C for pressure of 900 mbar. Spectra were measured with attenuations of microwave power [dB]: 15, 10, 5, and 0.5.



FIG.4. EPR spectra of yucca carbonized at 950°C for pressure of 900 mbar. Spectra were measured with attenuations of microwave power [dB]: 15, 10, 5, and 0.5.

Amplitudes of the spectra depend on temperature of plant heating. We measured strong EPR lines for bamboo and yucca pyrolysed at 550°C. The low amplitudes characterize resonance curves of plants carbonized at 750°C and 950°C. For example EPR spectra of bamboo heated at 550°C and 750°C for sample in air are compared in FIG.1. As one can see noisy spectrum is observed for samples heated at 750°C.

Exemplary EPR spectra of yucca pyrolysed at 550°C and 950°C for samples in vacuum are shown in FIGURES 2-3 and 4-5, respectively. Plants carbonized at 750°C and 950°C were rejected as oximetric probes. Their EPR signals were too low or revealed complex character. Complex structure of EPR spectra is clearly visible for yucca carbonized at 950°C.



carbonized at 550°C. Attenuation of microwave power was 15 dB.



FIG.3. EPR spectra of yucca carbonized at 550°C for pressure of 2 mbar. Spectra were measured with attenuations of microwave power [dB]: 15, 10, 5, and 0.5.



FIG.5. EPR spectra of yucca carbonized at 950°C for pressure of 2 mbar. Spectra were measured with attenuations of microwave power [dB]: 15, 10, 5, and 0.5.

We see two components differ in linewidths in these spectra (FIG.4-5). EPR spectra of this carbonized yucca is superposition of broad and narrow lines resulted from two types of paramagnetic centers in the sample. Similarity of these EPR spectra (FIG.4-5) with multi-component spectra of natural coal samples [11] is expected. Paramagnetic centers located in simple units consisting of a few aromatic rings are responsible for broad EPR component and  $\pi$  electrons delocalized on large aromatic structures give narrow component [11]. The data indicate that chemical structure of yucca carbonized at 950°C is more complicated in comparison to yucca heated at 550°C. Paramagnetic carbonized plants with multi-component EPR spectra should be rejected as oximetric probes, because calculations for such spectra are too complex.



FIG.7. Influence of microwave power on amplitudes of EPR lines of yucca carbonized at 550°C for samples in vacuum (10<sup>-5</sup> mbar).





FIG.8. Influence of microwave power on amplitudes of EPR lines of yucca carbonized at 950°C for samples in vacuum (10<sup>-5</sup> mbar).

As oximetric probes were proposed plants heated at 550°C with simple EPR spectra (FIG.2-3). Their EPR amplitudes strongly decrease with increasing of oxygen contents in the environment (FIG.6). Quasi-chemical bonds between carbon material and oxygen molecules are responsible for this effect. Exemplary correlation presented in FIG. 6 may be the reference curve for determination of oxygen content in the biological sample environment. In practice comparison of amplitudes of EPR spectra of carbon materials located in cell cultures and amplitudes in reference curves is necessary to obtain information about oxygen content in the tested cells.

Continuous microwave saturation of EPR technique was used to develop characteristic of aromatic structure of the studied carbonized materials. EPR spectra of samples carbonized at 550°C saturate at lower microwave powers than EPR spectra of plants heated at 750 and 950°C (FIG.7-8). It can be concluded that plants heated at 550°C proposed to oximetry contain lower condensed aromatic units as compared to samples heated at higher temperatures. Condensation of aromatic units led to decrease of paramagnetic carbon contents in these samples.

## Conclusions

On the basis of electron paramagnetic resonance studies of carbonized bamboo and yucca in air and in vacuum the following conclusions may be drawn:

1. The studied plant materials carbonized at 550°C, 750°C, and 950°C are paramagnetic.

2. Strong EPR lines characterize the analysed samples carbonized at 550°C and weak EPR lines reveal samples carbonized at both 750°C and 950°C.

3. Paramagnetic centers of the plant materials heated at 550°C, 750°C and 950°C interact with paramagnetic  $O_2$  molecules, what led to quenching of their EPR signals.

 Decrease of amplitudes of the recorded EPR spectra is stronger for highest oxygen concentrations in the sample environment.

5. Because of strong EPR lines and dependence of their amplitudes on oxygen concentration, bamboo and yucca carbonized at 550°C is proposed as oximetric probe in medicine.

## Acknowledgements

Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Science in Zabrze is thanked for support studies of carbonized plant materials for oximetry in medicine.

## References

[1] Jezierski A., Czechowski F., Drozd J., Jerzykiewicz M., Witek B.: Free radicals in natural transformations of organic matter: humification, coalification and carbonization processes, the maillard reactions, Molecular Physics Reports 18/19(1997) 115-119.

[2] Czechowski F., Jezierski A.: EPR studies of petrographic constituents of bituminous coals, chars and brown coal group components, and humic acids at 600°C char upon oxygen and solvent action, Energy&Fuels 11(1997) 951-964.

[3] Smirnova T.I., Smirnov R.B., Clarkson R.B., Belford R.L.: Magnetic susceptibility and spin exchange in fusinite and carbohydrate chars, Journal of Physical Chemistry 98 (1994), 24-68.

[4] Pilawa B., Więckowski A.B., Lewandowski M.: E.p.r. studies of thermal decomposition of vitrinite, Fuel 74(1995) 1654-1657.

[5] Pilawa B., Więckowski A.B., Lewandowski M.: E.p.r. studies of thermal decomposition of exinite and inertinite, Fuel 75 (1996) 1181-1185.
[6] Pilawa B., Więckowski A.B., Lewandowski M., Nassalski G.: Electron paramagnetic resonance studies of coal macerals. Influence of micorwave frequency and thermal decomposition, Erdöl Erdgas Kohle 114(1998) 37-40.

[7] Pilawa B., Więckowski A.B., Lewandowski M.: Application of EPR spectroscopy to the characterization of magnetic interactions in thermally decomposed coal, Magnetic Resonance in Chemistry 37(1999) 871-877.

[8] Pilawa B., Więckowski A.B., Lewandowski M.: EPR studies of thermal decomposition of coal samples, Nukleonika 42 (1997) 457-464.
[9] Krzesińska M., Pilawa B., Pusz S., Ng J.: Physical characteristic of carbon materials derived from pyrolysed vascular plants, Biomass and Bioenergy 30/2 (2006) 166-176.

[10] Pilawa B., Pietrzak R., Wachowska H., Babeł K.: EPR studies of carbonized cellulose - oxygen interactions, Acta Physica polonica A 108 (2005) 151-154.

[11] Pilawa B., Więckowski A.B.: Conmparative e.p.r. analysis of interactions between macerals and atmospheric oxygen, Fuel 76(1997) 1173-1177.

[12] Grucker D.: Oxymetry by magnetic resonance: applications to animal biology and medicine, Progress in Nuclear Magnetic Resonance 36 (2000) 241-270.

[13] Pandian R.P., Kutala V.K., Parinandi N.L., Zweier J.Z., Kuppusamy P.: Measurements of oxygen consumption in mouse aortic endothelial cells using a microparticulate oximetry probe, Archives of Biochemistry and Biophysics 420 (2003) 169-175.

[14] Lui K.J., Miyake M., James P.E., Swartz H. M.: Separation and enrichment of the active component of carbon based paramagnetic materials for use in EPR oximetry, Journal of Magnetic Resonance 1 (1998) 291-298.

[15] Gribnerg O.Y., Smirnov A.I., Swartz H.M.: High spatial resolution multi-site EPR oximetry, the use of a convolution-based fitting method, Journal of Magnetic Resonance 152(2001) 247-258.

[16] Sentjurc M., Cemazar M., Sersa G.: EPR oximetry of tumor in vivo in cancer therapy, Spectrochimica Acta PartA60 (2004) 179-185. [17] Jordan B.F., Baudelet Ch., Gallez B.: Carbon-centered radicals as oxygen sensors for in vivo electron paramagnetic resonance: screening for an optimal probe among commercially available charcoals, Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine 7 (1998) 121-129.

[18] Pilawa B., Latocha M., Kościelniak M., Pietrzak R., Wachowska H.: Oxygen effects in tumor cells during photodynamic therapy, Polish Journal of Environmental Studies 15(4A) (2006) 160-162.

[19] Kübler A.C.: Photodynamic therapy, Medical Laser Application 20 (2005) 37-45.

[20] Alexiades-Armenakas M.: Laser-mediated photodynamic therapy, Clinics in Dermatology 24 (2006) 16-25.

3

. . . . . . . . . . . . . . .

# CONDITIONS OF PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMOR CELLS EXAMINED BY CARBONIZED COAL AND EPR SPECTROSCOPY

Małgorzata Latocha<sup>1</sup>, Barbara Pilawa<sup>2\*</sup>, Robert Pietrzak<sup>3</sup>, Piotr Nowicki<sup>3</sup>, Helena Wachowska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY, SCHOOL OF PHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND <sup>2</sup> DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, SCHOOL OF PHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, JEDNOŚCI 8, 41-200 SOSNOWIEC, POLAND <sup>3</sup> LABORATORY OF COAL CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, INSTITUTE OF CHEMISTRY, ADAM MICKIEWICZ UNIVERSITY, GRUNWALDZKA 6, 60-780 POZNAŃ, POLAND \*E-MAIL: BPILAWA@SLAM.KATOWICE.PL

# Abstract

4

Coal samples carbonized at 600°C and TEMPO probes we applied in oximetry. EPR spectra of medium-ranked coal carbonized at 400, 500, and 700 °C were not sensitive to oxygen. Oxygen effects during photodynamic therapy of tumor cells were tested. Oximetric probes were used to examination of singlet oxygen O<sub>2</sub> formation in melanotic CRL-1424 tumor cells irradiated by laser (500 mW,  $\lambda$ =662 nm) at the presence of photolon as the photosensitizer. Tumor cells were irradiated during 7, 15, and 30 minutes. Changes in EPR spectra of coal probe and TEMPO after excitation of oxygen O<sub>2</sub> from triplet ground state (S=1) to diamagnetic singlet (S=0) state were analysed. Measurements of EPR spectra of coal carbonized at 600°C and TEMPO in: control cell culture, irradiated cells, and cells irradiated at the presence of photolon, were done. After PDT intensity of EPR lines of the used oximetric probes considerably increases. It was proved that the strongest formation of singlet oxygen in the studied cells appears after 15 minutes of laser irradiation.

*Keywords:* paramagnetic centers, PDT, oximetric probes, EPR

[Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 4-6]

# Introduction

Free radicals and diamagnetic oxygen molecules  $O_2$  destroy tumor cells during photodynamic therapy (PDT) [1]. It is known three different types of free radicals mechanisms in irradiated cells [1-3]. Free radicals are formed: 1) by laser irradiation, 2) after cells interactions with excited photosensitizer (for low oxygen concentration in cells), and, 3) in reactions of excited by photosensitizer diamagnetic oxygen  $O_2$  molecules with cells (for high oxygen concentration in cells). Intensive production of both free radicals and reactive singlet oxygen is expected in optimal PDT.

In this work we searched high amount of singlet oxygen  $O_2$  in melanotic tumor cells irradiated by laser at the presence of the photosensitizer. Paramagnetic probes we used in oximetry of irradiated cells. It is known that coal samples strongly interact with paramagnetic oxygen  $O_2$  [4-6], and they are ambient for cell culture [7]. Coal samples and TEMPO we proposed as oximetric probes.

. . .

.....

# Materials and methods

## Sample characterization

Photodynamic therapy of CRL-1424 tumor cells obtained from American Type Culture Collection (ATCC) was studied. The cells were grown in monolayer in Eagle's minimal Essential medium with Earle's BSS and 2mM L-glutamine (EMEM). The medium was supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin. The cell culture was incubated at 37°C and in humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Photolon (100 µg/mL) was used as photosensitizer.

The cells were irradiated by laser with wave 662 nm and power 500 mW. The number of cells in the cultures was determined by contrast phase OLYMPUS IX50 optical microscope. We used different times of laser irradiation: 7, 15, and 30 minutes.

## **EPR** measurements

The measurements were performed by the use of an X-band (9.3 GHz) electron paramagnetic resonance spectrometer with magnetic modulation of 100 kHz. Microwave frequency was measured with MCM 101 recorder. In order to avoid microwave saturation EPR spectra of the oximetric probes were detected at low microwave power equal 0.7 mW.

Oxygen effects were studied by the use of oximetric probes: coal samples and TEMPO. Coal with a carbon content 64.8 wt% was heated at 400, 500, 600, 700 and 800°C. As oximetric probe was selected coal carbonized at 600°C with a carbon content 85.1 wt%, because of strong changes of its EPR lines in oxygen atmosphere.

Changes in EPR spectra of coal probe (600°C) and TEMPO caused by laser excitation of oxygen  $O_2$  molecules to diamagnetic (S=0) state were analysed. The spectra of coal carbonized at 600°C and TEMPO located in control cell culture, irradiated cells, and cells irradiated at the presence of photolon, were compared.

# **Results and discussions**

CRL-1424 cells are destroyed after laser irradiation and their number in cultures decreases. Death of tumor cells after laser irradiation is clearly visible from microscopic observations presented in FIGURE 1. Lower amount of tumor cells exist in irradiated culture (FIG.1b) than in control culture (FIG.1a).



FIG.1. CRL-1424 cell cultures before (a) and after (b) laser irradiation at the presence of photolon as photosensitizer.



FIG.2. Cell number in control cell culture, control cell culture with photolon, and in irradiated cell culture without and with photolon.

Decrease of cell number in culture after laser irradiation is compared in FIGURE 2. The lower number of cells we obtained after laser irradiation of cells at the presence of photosensitizer. The number of cells in culture decreases with increasing of irradiation time.

EPR spectra of coal carbonized at 400, 500, 600, 700 and 800°C for samples in air were compared in FIGURE 3.



FIG.3. EPR spectra of coal carbonized at 400, 500, 600, 700 and 800°C for dry powdered samples in air.

Strong EPR lines were observed for coal heated at 400, 500, and 600°C. Only a weak EPR signal was measured for coal carbonized at 700°C. EPR lines were not measured for sample carbonized at 800°C. Concentrations of paramagnetic centers N in coal samples and parameters of their lines in air and in nitrogen N<sub>2</sub> environment are compared in TABLE 1. Higher concentrations were obtained for coal samples in nitrogen atmosphere.

		AIR			EN	
T [°C]	Nx10 <sup>18</sup> [spin/g]	∆B <sub>pp</sub> [mT]	g [ <u>+</u> 0.0002]	Nx10 <sup>18</sup> [spin/g]	∆B <sub>pp</sub> [mT]	g [ <u>+</u> 0.0002]
400	7.7	0.68	2.0034	7.9	0.67	2.0034
500	5.8	0.61	2.0033	6.2	0.58	2.0033
600	3.7	0.58	2.0033	4.8	0.52	2.0031
700	0.005	0.63	2.0029	0.006	0.58	2.0028

TABLE 1. Paramagnetic centers concentrations (N), g-factors and linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR spectra of coal samples carbonized at different temperatures. Data for samples in air and nitrogen atmosphere are compared.



# FIG.4. EPR spectra of coal oximetric probe and TEMPO located in the cells irradiated during 15 minutes by laser at the presence of photolon.

EPR lines of coal carbonized at 600°C saturate at the relatively higher microwave power. Such correlation is characteristic for multi-ring aromatic units [4-5]. Unpaired electrons of such molecular structures strongly interact with paramagnetic  $O_2$  molecules [4-5]. The correlation indicates our proposal that sample carbonized at 600°C is valuable oximetric probe.

So as oximetric probe we selected coal carbonized at 600°C and additionally TEMPO. Exemplary EPR spectra of this coal probe and TEMPO in cell culture are shown in FIGURE 4. Parameters of EPR lines of coal oximetric probe (600°C) and TEMPO located in control cells, cells with photolon, cells irradiated by laser without and at the presence of photolon, are presented in TABLE 2 and 3. Intensities of their EPR lines increase after laser irradiation at the presence of photolon. Prolongation of irradiation time from 15 to 30 minutes gives decrease of EPR signals of both coal and TEMPO probes.

Similar effects appear during photodynamic therapy of SK melanotic tumor cells with coal and TEMPO probes [3]. Laser irradiation causes excitation of paramagnetic oxygen molecules (S=1) from ground triplet state to diamagnetic singlet state (S=0). Decrease of concentration of paramagnetic oxygen molecules in the environment of cells.

In this work we confirmed usefulness of coal probes to examination of oxygen effects in laser irradiated tumor cells. After laser irradiation of tumor cells concentration of paramagnetic oxygen  $O_2$  molecules (S=1) decreases and amount of diamagnetic (S=0) excited oxygen molecules increases. Excitation of oxygen molecules in irradiated cell culture is accompanied by rise of intensity of EPR line of coal probe (TABLE 2). Creation of quasi-chemical bonds between paramagnetic oxygen  $O_2$  and coal quenches its EPR signal [4].

Oximetric probe located in:	t [min]	ا [a.u.]	ΔB <sub>pp</sub> [mT]	g [ <u>+</u> 0.0002]
Control cell culture	0	2.45	0.36	2.0031
Cell culture with photolon	0	3.64	0.35	2.0031
Irradiated cells without photosensitize	7	1.78	0.35	2.0033
Irradiated cells with photolon	7	1.32	0.36	2.0032
Irradiated cells without photosensitize	15	3.34	0.37	2.0031
Irradiated cells with photolon	15	2.38	0.38	2.0031
Irradiated cells without photosensitize	30	3.18	0.38	2.0031
Irradiated cells with photolon	30	3.02	0.39	2.0033

TABLE 2. Integral intensities (I), linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) and g-factors of EPR spectra of the tested oximetric probes in cell culture during different conditions of photodynamic therapy. Cells were irradiated by laser during times (t): 7, 15, and 30 minutes. Data for coal probe carbonized at 600°C are shown.

5

Oximetric probe located in:	t [min]	l (-1) [a.u.]	∆B <sub>pp</sub> <sup>(-1)</sup> [mT]	l (0) [a.u.]	$\Delta B_{pp}^{(0)}$ [mT]	l (+1) [a.u.]	∆B <sub>pp</sub> <sup>(+1)</sup> [mT]	т <sub>с</sub> х10- <sup>"</sup> [s]
Control cell culture	0	1.16	0.23	1.55	0.23	0.59	0.18	1.2
Cell culture with photolon	0	3.55	0.23	3.94	0.23	2.10	0.21	0.6
Irradiated cells without photosensitizer	7	0.87	0.27	0.51	0.21	0.40	0.19	0.1
Irradiated cells with photolon	7	11.02	0.21	13.71	0.23	9.02	0.21	0.5
Irradiated cells without photosensitizer	15	0.43	0.22	0.74	0.24	0.35	0.24	1.1
Irradiated cells with photolon	15	17.09	0.24	22.29	0.25	10.78	0.22	0.9
Irradiated cells without photosensitizer	30	0.53	0.23	0.57	0.23	0.14	0.14	1.6
Irradiated cells with photolon	30	7.45	0.23	8.13	0.23	3.46	0.18	0.8

TABLE 3. Integral intensities (I) and linewidths ( $\Delta B_{pp}$ ) of EPR lines of TEMPO probe in cell culture during different conditions of photodynamic therapy. Time (t) of laser irradiation was: 7, 15, and 30 minutes.

Diamagnetic oxygen molecules do not form such bonds and as the result increase of EPR signal appear.

In this work we proposed coal sample as oximetric probe in biological systems, because of its strong EPR line and high susceptibility to oxygen. Additionally this sample does not effect on cells in cultures. We observed similar growing of cell culture without and at the presence of coal probe. Such properties may possible observations of influence of photodynamic therapy on tumor cells and the optimal therapeutic conditions may be found.

As the second oximetric probe we tested TEMPO. Our experiment proved usefulness of TEMPO probe in oximetry and tumor cells studies. Similarly to coal probe intensity of EPR line of TEMPO increase after excitation of oxygen molecule from triplet to singlet oxygen.

Paramagnetic oximetric probes are known from a lot of work [7-14], but probes examined in our studies may be applied to cells, tissues and others biological species. The high sensitivity of their EPR spectra to oxygen  $O_2$  magnetic state and absence of toxic reactions in cell medium are mainly important.

Our work indicates that electron paramagnetic spectroscopy and oximetric probes may be practically used in clinical applications. We use physical methods to determine of optimal conditions of photodynamic therapy of CRL-1424 tumor cells. Optimal conditions of PDT we found for laser irradiation of cells at the presence of photolon during 15 minutes. The lower amount of singlet oxygen is formed in tumor cells after laser irradiation during 30 minutes (TABLES 2,3).

# Conclusions

On the basis of EPR examination of tumor cells irradiated by laser the following conclusion may be drawn:

1. Coal samples carbonized at  $600^{\circ}$ C and TEMPO may be used as oximetric probes for photodynamic therapy of CRL-1424 cells. Paramagnetic oxygen O<sub>2</sub> molecules strongly interact with these samples and decrease their EPR amplitude.

2. Singlet oxygen formation is more effective during laser irradiation of the studied cells at the presence of photolon.

3. The best conditions of PDT of CRL-1424 tumor cells appear when 15 minutes time of laser irradiation was applied.

# References

[1] Uzdensky A., Dergacheva O.Y., Zhavoronkova A.A, Reshetnikov A.V, Ponomarev G.V.: Photodynamic effect of novel chlorine (6) derivatives on a single cell. Life Science 74 (2004) 2185-97.

[2] Latocha M., Pilawa B., Kuśmierz D., Zielińska A., Nawrocka D.: Changes in free radicals system on IMR-90 and C-32 cells during photodynamic therapy. Polish Journal of Environmental Studies. Polish Journal of Environmental Studies 15 (2006) 154-156.

[3] Pilawa B., Latocha M., Kościelniak M., Pietrzak R., Wachowska H.: Oxygen effects in tumor cells during photodynamic therapy. Polish Journal of Environmental Studies 15 (2006) 160-162.

[4] Pilawa B., Trzebicka B., Więckowski A. B., Hanak B., Komorek J., Pusz S.: EPR Spectra of Exinite, Vitrinite and Inertinite. Influence of Microwave Saturation and Sample Evacuation. Erdöl & Kohle Erdgas Petrochemie – Hydrocarbon Technology 44 (1991) 421-425.
[5] Pilawa B., Więckowski A.B.: Comparative EPR analysis of interactions between macerals and atmospheric oxygen. Fuel 76 (1997) 1173-1177.

[6] Jordan B.F., Baudelet Ch., Gallez B.: Carbon-centered radicals as oxygen sensors for in vivo electron paramagnetic resonance: screening for an optimal probe among commercially available charcoals. MAGMA Magnetic Resonance Materials in Physics Biology and Medicine 7 (1998) 121-129.

[7] Santini M.T.: Corrigendum to 'The new EPR molecular oxygen probe fusinite is not toxic to cells'. Biochimica et Biophysica Acta 1379 (1998) 161-170.

[8] Diakova G., Bryant R.G.: The aqueous reference for ESR oximetry Journal of Magnetic Resonance 178 (2006) 329-333.

[9] Liu K.J., Miyake M., James P.E., Swartz H.M.: Separation and enrichment of the active component of the carbon based paramagnetic materials for use in EPR oximetry. Journal of Magnetic Resonance 133 (1998) 291-298.

[10] Mizoguchi K., Kachi N., Sakamoto H., Yoshioka K., Masubuchi S., Kazama S.: The effect of oxygen on the ESR linewidth in polypyrrole doped by PF6. Solid State Communications 105 (1998) 81-84.
[11] Ilangovan G., Zweier J.L., Kuppusamy P.: Mechanism of oxygen-induced EPR line-broadening in lithium phthalocyanine microcrystals Journal of Magnetic Resonance 170 (2004) 42-48.
[12] Venkataraman S., Martin S.M., Schafer F.Q., Buettner G.R.: Detailed methods for the quantification of nitric oxide in aqueous solutions using either an oxygen monitor or EPR. Free Radical in Biology and Medicine 29 (2000) 580-585.

[13] Ligeza A., Tikhonov A.N., Subczynski W.K.: In situ measurements of oxygen production and consumption using paramagnetic fusinite particles injected into a bean leaf. Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics 1319 (1997) 133-137.

[14] He Y-Y, Jlang L-L: Synthesis and EPR Investigations of new aminated hypocrellin derivatives. Free Radical in Biology and Medicine 28 (2000) 1642–1651.

•••••

# INFLUENCE OF OXYGEN O<sub>2</sub> ON MICROWAVE SATURATION OF EPR LINES OF PLANTS CARBO-NIZED AT 650°C AND POTENTIAL APPLICATION IN MEDICINE

Barbara Pilawa\*, Sylwia Bartłomiejczyk, Marta Krzesińska, Sławomira Pusz, Justyna Zachariasz, Wojciech Wałach

CENTRE OF POLYMER AND CARBON MATERIALS, POLISH ACADEMY OF SCIENCE, MARII CURIE SKŁODOWSKIEJ 34, 41-819 ZABRZE, POLAND \*E-MAIL: BPILAWA@KARBOCH.GLIWICE.PL

## Abstract

Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) was used to examination of spin-lattice relaxation in vascular plants carbonized at 650°C. Application of EPR method of continuous microwave signal saturation in medicine was proposed. The first derivative EPR spectra of pyrolysed bamboo and yucca were measured for samples in air and in vacuum. Influence of microwave power in the range 0.7-100 mW on amplitudes of EPR lines were evaluated. It was stated that amplitudes of the studied carbon materials increase with increasing of microwave power in the studied range. Saturation of EPR lines was not observed, so fast spin-lattice relaxation processes exist in the analyzed materials. Changes of EPR amplitudes for samples in air were slower than for evacuated samples. This effect may be used for determination of oxygen contents in the biological cells cultures and for analysis of optimal parameters of photodynamic therapy of cancer.

**Keywords:** carbonized plants, electron paramagnetic resonance, EPR, microwave saturation, paramagnetic centers, oximetry

[Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 7-9]

# Introduction

Samples sensitive to oxygen contents in the environment are used to examination biochemical processes and conditions of medicinal therapies [1-6]. Application of carbon materials in oximetry is known [2-4]. Carbon materials, especially fusinite [2-3] are ambient for cells. It is difficult to obtain fusinite so the new carbon probes for oximetry were searching in this work. Microwave saturation of EPR spectra depends on the sample environment [7-8]. Paramagnetic coal samples physically interact with oxygen molecules [9-10].

In this work we continue EPR studies of carbonized plant materials [11-12]. Characteristic of paramagnetic centers in yucca and bamboo carbonized at 550 and 950°C for samples in contact with air was presented earlier [11-12]. In this work we search EPR parameter dependent on oxygen content in the sample environment and which is useful to oximetry. Correlations between microwave saturation of EPR lines of the paramagnetic carbonized materials and  $O_2$  contents in the tubes with sample were examined.

## Materials and methods

Bamboo (Bambusa vulgaris) and yucca (Yucca flaccid) pyrolysed at 650°C in the neutral atmosphere were studied. Microscopic images of bamboo and yucca carbonized at 650°C at different cross-sections are shown in FIG.1-2 (a,b,c).

The spectroscopic measurements for samples in air and in different degrees of vacuum were done by the electron paramagnetic resonance spectrometer at X-band (9.3 GHz) with magnetic modulation of 100 kHz. Microwave frequency was recorded. EPR measurements were done for samples in air and in vacuum (900-10<sup>-5</sup> mbar). Changes of amplitudes and linewidths of EPR lines of the studied materials with increasing of microwave power from 0.7mW to 100mW were measured. g-Values were calculated from resonance condition by the use of resonance magnetic field and microwave frequency.

# **Results and discussions**

No EPR lines were measured for original plant samples. Asymmetrical EPR spectra were recorded for bamboo and yucca carbonized at 650°C. After bamboo and yucca heating at the mentioned temperature paramagnetic centers appear in these samples and strong EPR spectra were recorded. Dependencies of these spectra on microwave power and paramagnetic oxygen molecules content in sample environment were observed. Exemplary EPR spectra of carbonized bamboo and yucca for samples in air are presented in FIGURES 3 and 4, respectively. Exemplary EPR spectra of carbonized bamboo and vucca for evacuated samples (10-5 mbar) are shown in FIGURES 5 and 6, respectively. EPR spectra recorded with attenuations from 15 dB to 0.5 dB were compared (FIGs.3-6). Decrease of attenuation from 15 dB to 0.5 dB led to increase of microwave power (FIGs.3-6). All effects discussed in this paper increase with increasing of vacuum degree from 900 mbar to 10<sup>-5</sup> mbar. In this work we shown representative results for the highest degree of vacuum (10<sup>-5</sup> mbar).



FIG.1. Various sections of bamboo carbonized at 650°C: a) cross-section of the stem – internal structure; magn. 80x, in air; b) intersection along the stem – internal structure of single fibre; magn. 500x, in oil; c) intersection along the stem – the structure of interfibrous area; magn. 500x, in oil.

7



FIG.2. Various sections of yucca carbonized at 650°C: a) Intersection along the stem. Fibrous structure; magn. 160x, in air; b) Intersection along the stem. Fibrous structure. Pores in walls of fibres; magn. 500x; c) Cross –section of the stem. Various diameters of fibres and different thickness of walls; magn. 500x, in oil.



FIG.3. EPR spectra of bamboo carbonized at  $650^{\circ}$ C for sample in air. The lines were recorded with attenuations (dB): 15, 10, 5 and 0.5.



FIG.5. EPR spectra of bamboo carbonized at 650°C for sample in vacuum ( $10^{-5}$  mbar). The lines were recorded with attenuations (dB): 15, 10, 5 and 0.5.



FIG.7. Influence of microwave power (M) on amplitudes of EPR lines of bamboo carbonized at 650°C for samples in air and in vacuum (10<sup>-5</sup> mbar).



FIG.4. EPR spectra of yucca carbonized at 650°C for sample in air. The lines were recorded with attenuations (dB): 15, 10, 5 and 0.5.



FIG.6. EPR spectra of yucca carbonized at  $650^{\circ}$ C for sample in vacuum ( $10^{-5}$  mbar). The lines were recorded with attenuations (dB): 15, 10, 5 and 0.5.



FIG.8. Influence of microwave power (M) on amplitudes of EPR lines of yucca carbonized at 650°C for samples in air and in vacuum (10<sup>-5</sup> mbar). Linewidths of EPR spectra strongly changes after removing of paramagnetic  $O_2$  molecules from the tube where samples were located. EPR lines for evacuated samples of both carbonized bamboo and carbonized yucca (FIGs.5-6) were narrower than EPR lines of sample in contact with  $O_2$ (samples in air) (FIG.3-4). Broadening of EPR lines in air results from dipolar interactions of paramagnetic centers of carbonized materials with paramagnetic oxygen molecules.

Linewidths of the recorded EPR spectra increase with increasing of microwave power. This correlation is characteristic for homogeneous broadening of resonance curves [7-8]. It can be concluded that paramagnetic centers are homogeneously distributed in the tested carbonized plant materials. Carbonization process indicates rupturing of chemical bonds in the whole heated plant materials.

g-Values of paramagnetic centers in the carbonized materials were 2.0030. Mainly paramagnetic centers with unpaired electrons localized on carbon or nitrogen atoms exist in the heated plants samples. g-Factor did not change with degree of vacuum and it was the same for evacuated samples as for samples in air.

EPR spectra depend on microwave power used during this experiment. It was stated that amplitudes of EPR lines of the studied carbon materials increase with increasing of microwave power up to 100 mW (FIGs.7-8). Microwave saturation effect was not obtained for the recorded spectra. It means that fast spin-lattice relaxation processes [7-8] exist in the carbonized plant materials. Amplitudes of the EPR lines did not reach the maximal value and the decrease of amplitudes with increasing of microwave power at saturation conditions was not observed. Differences in microwave saturation of EPR spectra of the carbonized samples in air and in vacuum are clearly visible. EPR lines of evacuated samples changes faster with microwave power and the lines of samples in air begin saturate. Additionally amplitudes of EPR lines of the analysed plant materials are lower for samples in air than for evacuated samples (FIGs.7-8). Quasi-chemical bonds between oxygen molecules and samples are responsible for this effect. Similar correlations were observed for coals [9-10].

Results obtained in this work may be developed and used in medicine. It was proved for plant materials that not only amplitudes and linewidths, but also microwave power of microwave saturation of their EPR lines depends on oxygen contents in the sample environment. Correlations between microwave saturation of EPR lines and oxygen contents in the environment may be used in oximetry for photodynamic therapy. Excited singlet oxygen molecules and free radicals damage tumor cells during photodynamic therapy [13-14]. Measurements of microwave saturation of EPR lines of bamboo and vucca carbonized at 650°C located in laser irradiated cells give information about singlet oxygen formation. Increase of diamagnetic singlet oxygen contents in the biological system refers to decrease of paramagnetic triplet oxygen in ground state. Higher formation of singlet oxygen is accompanied by stronger changes in microwave saturation.

## Conclusions

Continuous microwave saturation of EPR spectra of bamboo and yucca carbonized at 650°C indicates that:

1. Strong paramagnetism characterizes the studied plant materials carbonized at 650°C for samples in both air and vacuum.

2. Paramagnetic  $\mbox{O}_2$  molecules quench EPR lines of the carbonized materials.

3. Fast spin-lattice relaxation processes exist in the studied plant samples.

4. Paramagnetic oxygen molecules  $O_2$  change spin-lattice relaxation processes in the plant materials carbonized at 650°C.

5. Dependence of microwave saturation of EPR lines of the carbonized plants with degree of vacuum may be used for determination of oxygen contents in biological cells cultures and for analysis of optimal parameters of photodynamic therapy of cancer.

# Acknowledgements

Centre of Polymer and Carbon Materials, Polish Academy of Science in Zabrze is thanked for support studies of carbonized plant materials for oximetry in medicine.

## References

 Dunn J. F., Swartz H. M.: In vivo electron paramagnetic resonance oximetry with particulate materials, Methods 30 (2003) 159-166.
 Santini M. T., Cametti C., Straface E., Floridi A., Flamma F., Paradisi S., Malorni W.: The new EPR molecular oxygen probe fusinite is not toxic to cells, Biochimica et Biophysica Acta 1379 (1998) 161-170.

[3] Ligeza A. Tikhonov A. N. Subczynski W. K.: In situ measurements of oxygen production and consumption using paramagnetic fusinite particles injected into a bean leaf, Biochimica et Biophysica Acta 1319 (1997) 133-1337.

[4] Atsarkin V. A., Demidov V. V., Vasneva G. A., Dzheparov F. S., Ceroke P. J., Odintsov B. M., Clarkson R. B.: Mechanism of oxygen response in carbon-based sensors, Journal of Magnetic Resonance 149 (2001) 85-89.

[5] Manivannan A., Yanagi H., Ilangovan G., Kuppusamy P.: Lithium naphthalocyanine as a new molecular radical probe for electron paramagnetic resonance oximetry, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 223 (2001) L131-L135.

[6] Pilawa B., Latocha M., Kościelniak M., Pietrzak R., Wachowska H.: Oxygen effects in tumor cells during photodynamic therapy, Polish Journal of Environmental Studies 15 (2006) 160-162.

[7] Stankowski J., Hilczer W.: Pierwszy krok ku radiospektroskopii rezonansów magnetycznych, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 1994.

[8] Eaton G. R., Eaton S. S., Salikhov K. M. (Eds.): Foundations of Modern EPR, World Scientific Publishing Co., Singapore, New Jersey, London, Hong Kong 1998.

[9] Pilawa B., Trzebicka B., Więckowski A. B., Hanak B., Komorek J., Pusz S.: EPR spectra of exinite, vitrinite and inertinite. Influence of microwave saturation and sample evacuation, Erdol & Kohle Erdgas Petrochemie – Hydrocarbon Technology 44 (1991) 421-425.

[10] Pilawa B., Więckowski A. B.: Comparative e.p.r. analysis of interactions between macerals and atmospheric oxygen, Fuel 76 (1997) 1173-1177.

[11] Krzesińska M., Pilawa B., Pusz S., Ng J.: Biologiczne prekursory dla tzw. "drewnianych" ceramik (woodceramics) – otrzymywanie i właściwości, Inżynieria Materiałowa 1(149) (2006) 32-36.

[12] Krzesińska M., Pilawa B., Pusz S., Ng J.: Physical characteristics of carbon materials derived from pyrolysed vascular plants, Biomass & Bioenergy 30 (2006) 166-176.

[13] Graczyk A.: Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów, Dom Wydawniczy Bellona, Warszawa 1999.

[14] Podbielska H., Sieroń A., Stręk W.: Diagnostyka i terapia fotodynamiczna, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004. 10

# WŁAŚCIWOŚCI DRUTÓW STOSOWANYCH W ZABIEGU NEFROSTOMII

Anna Sołtysek¹, Joanna Przondziono²\*, Janusz Szala³, Jan Kawecki⁴

 <sup>1</sup> Studenckie Koło Naukowe MEDITECH
 <sup>2</sup> Politechnika Śląska w Katowicach, Katedra Modelowania Procesów i Inżynierii Medycznej
 <sup>3</sup> Politechnika Śląska w Katowicach, Katedra Nauki o Materiałach
 <sup>4</sup> Szpital im. Prof. Michałowskiego w Katowicach
 \*E-mail: Joanna.przondziono@polsl.pl

## [Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 10-12]

# Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój metod leczenia chorób układu moczowego zaowocował różnorodnością w wyborze odpowiedniego dla każdego przypadku sposobie postępowania diagnostycznego, czy też leczniczego. Pacjenci wymagający doraźnej pomocy w sytuacji, w której dochodzi do zablokowania odpływu moczu z nerki, np. z powodu obecności kamienia, bardzo często poddawani są zabiegowi nefrostomii, czyli wytworzeniu przetoki nerkowej. Przezskórna przetoka nerkowa (ppn) jest jednym ze sposobów ponadpecherzowego odprowadzenia moczu. Od roku 1955, kiedy to po raz pierwszy zastosował ją Goodwin, ppn przeszła szybką drogę ewolucji, znajdując coraz powszechniejsze zastosowanie w urologii. Metoda ta jest wykorzystywana w diagnostyce i leczeniu; służy zarówno odprowadzeniu moczu z nerki, jak również stwarza alternatywny dostęp do górnych dróg moczowych, przykładowo w zabiegach kruszenia kamieni moczowych. Sam termin nefrostomii odnosi się do wytworzenia kanału, przetoki utrzymywanej przez rurkę lub cewnik, który perforuje skórę, przechodzi przez ciało i miękisz nerkowy, a kończy się w miedniczce bądź kielichu nerkowym [1,2].

W pracy przedstawiono charakterystykę drutów prowadzących stosowanych w zabiegu nefrostomii. Pomiarów drutów dokonano metodami metalografii ilościowej wspomaganej komputerowo. Przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego z emisją polową FE SEM S 4200 HITACHI współpracującego ze spektrometrem Voyager 3500 NORAN INSTRUMENTS przeprowadzono jakościową i ilościową analizę składu chemicznego. Ustalono właściwości mechaniczne drutów.

# Technika zabiegu – wykonanie przetoki nerkowej

Zabieg wykonuje się w miejscowym znieczuleniu wykorzystując wizualizację ultrasonograficzną lub rentgenowską. Chory ułożony jest na plecach z uniesionym ku górze bokiem. Po uprzednim nacięciu skóry i powięzi w linii pachowej środkowej lub części tylnej, poniżej XII żebra przez dolny lub środkowy kielich miedniczki nerkowej wprowadza się igłę punkcyjną z nałożoną na nią koszulką polietylenową. W USG lub RTG należy sprawdzić położenie igły, z której po usunięciu mandrylu wycieka kroplami mocz. Po usunięciu igły przez kanał koszulki wprowadza się elastyczny drut prowadzący. Druty składają się ze sprężyny, wewnątrz której znajduje się rdzeń stalowy. Pomimo, że końcówka drutu jest zakończona tak, aby zapobiec uszkodzeniu ścian układu

# PROPERTIES OF WIRE USED IN NEPHROSTOMY

Anna Sołtysek<sup>1</sup>, Joanna Przondziono<sup>2\*</sup>, Janusz Szala<sup>3</sup>, Jan Kawecki<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MEDITECH - Students Scientific Circle <sup>2</sup>Silesian Technical University, Department of Process Modelling and Medical Engineering <sup>3</sup>Silesian Technical University, Department of Materials Science <sup>4</sup>Prof. Michalowski Hospital in Katowice \*e-mail: joanna.przondziono@polsl.pl

## [Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 10-12]

# Introduction

Dynamic development of methods of urinary system diseases treatment resulted in a variety of choice in diagnostic or remedial methods suitable for each case. Patients who require immediate help in the situation when urine drainage from kidney is blocked due to e.g. the presence of renal stone, very often undergo the treatment of nephrostomy, i.e. creation of renal fistula. Transdermal renal fistula (trf) is one of the ways of over-urinary bladder urine drainage. Since 1955, when it was used for the first tome by Goodwin, trf has evolved rapidly, finding its application in urology. This method is used in diagnostic as well as treatment; it serves both: to drain urine from kidney and create alternative access to upper urinary tracts, for example when crushing renal stones. The term 'nephrostomy' itself pertains to the formation of a channel, a fistula supported by a cannula or catheter perforating the skin, passes through flesh and renal parenchyma and ends in renal pelvis or renal calyx [1,2].

This elaboration presents characteristics of guide wire used in nephrostomy. Wire measurement was made by means of computer aided quantitative metallography. By means of a scanning electron microscope with field emission FE SEM S 4200 HITACHI cooperating with spectrometer Voyager 3500 NORAN INSTRUMENTS, a qualitative and quantitative analysis of chemical composition was made. Wire mechanical properties have been established.

# Treatment technology – performance of renal fistula

This treatment is performed with topical anaesthesia, making use of ultrasonographic or X-ray visualisation. The patient is placed on his back with his side raised. After initial incision of skin and fascia in the middle axillary line or in the back part, below the XII<sup>th</sup> rib through lower or middle calvx of renal pelvis, a puncture needle with a polythene jacket put on it is inserted. The position of the needle, from which after the mandrill has been removed urine drips, must be checked on the ultrasonograph or radiograph. When the needle has been removed, elastic guide wire is inserted through the jacket. The wire is made of a spring, inside of which steel core is placed. In spite of the fact that wire tip is ended in such a way to prevent damage to the walls of renal calyx-pelvis system, the wire must be inserted in a gentle and careful manner. Along the wire, in order to widen the channel of the fistula, dilatators are inserted. They are inserted to the previously determined depth. When dilatators have been removed, an auto-static catherer (pig-tail) is inserted to the channel, and if there isn't one - a fluty catherer.

kielichowo-miedniczkowego nerki, drut należy wprowadzać ostrożnie i delikatnie. Wzdłuż drutu w celu rozszerzenia kanału przetoki wprowadzane są rozszerzadła. Wprowadza się je na wcześniej ustaloną głębokość. Przez wytworzony kanał, po usunięciu rozszerzadeł, wprowadza się do miedniczki autostatyczny cewnik (pig-tail), a jeśli go brak – cewnik fletowy. Po ustaleniu jego położenia przyszywa się go do skóry pojedynczym szwem [3-5].

# Badania drutów stosowanych w zabiegu nefrostomii

Badaniom poddano dwa druty firmy Braun o podobnej budowie i długości, ale różniące się średnicą. Druty zbudowane są na całej długości ze sprężyny nawiniętej z drutu okrągłego, wewnątrz której znajduje się stalowy rdzeń. Zakończone są z obu stron w jednakowy sposób.



RYS.1. Drut średnicy 0,56 mm stosowany w nefrostomii. FIG.1. Wire with diameter of 0,56 mm used in nephrostomy.

### Drut średnicy 0,56 mm

Długość drutu wynosiła 1102,5 mm. RYS.1 pokazuje drut do nefrostomii wraz z końcówką. Zdjęcie wykonano na elektronowym mikroskopie skaningowym FE SEM S-4200 HITACHI.

Elementy tworzące drut stosowany w zabiegu nefrostomii stanowią:

sprężyna wykonana z drutu okrągłego średnicy 118 μm,
drut rdzeniowy średnicy 304 μm.

Analiza jakościowa i ilościowa przeprowadzona na skaningowym mikroskopie elektronowym wykazała, że zarówno drut, z którego została wykonana sprężyna, jak i drut rdzeniowy wykonane zostały z kwasoodpornej stali chromowo-niklowej (RYS.2).



When its position has been established, it is sewn to the skin with a single stitch [3-5].

# Wire testing of wire used in nephrostomy

Two wires have been tested, both of similar structure, but with different diameters (from Braun Company). The wires are made on their entire length of spring reeled from a round wire, inside of which a steel core is placed. They are edged in the same way from both ends.

## Wire with diameter of 0.56 mm

Wire with diameter of 1102.5 mm. FIG.1 shows wire for nephrostomy together with its tip. The picture was taken by means of a scanning electron microscope FE SEM S 4200 HITACHI.

The elements that make up the wire are as follows:

- $\bullet$  spring made of round wire with diameter of 118  $\mu m,$
- $\bullet$  core wire with diameter of 304  $\mu m.$

Qualitative and quantitative analysis, made on a scanning electron microscope, proved that both: the wire from which spring was made and core wire, have been made of acid-proof chromium-nickel steel (FIG.2).

Analysis of carbon content has been made by means of infrared absorption method on analyser of LECO CS-244. It proved that the wire the spring is made of contains 0.16% C, whereas the content of carbon in core wire is 0.13% C.

Testing of mechanical properties made by means of Instron tester proved that core wire is characterised by tensile strength  $R_m$ =1613 MPa and unit elongation  $A_{100}$ =2.7%.

Element	K–ratio (calc.)	ZAF	Atom%	Element Wt%	Wt% Err. (1-Sigma)
Cr - K	0.2338	0.887	22.02	20.73	+/- 0.99
Fe - K	0.7020	1.013	70.33	71.13	+/- 1.42
Ni - K	0.0777	1.050	7.54	8.14	+/- 0.90
Total			100.00	100.00	

RYS.2. Widmo promieniowania rentgenowskiego zarejestrowane dla próbki drutu ze stali chromowo-niklowej oraz wyniki ilościowej oceny składu chemicznego tej stali. FIG.2. X-ray spectrum recorded for a sample of wire made of chromium-nickel steel and the results of quantitative evaluation of chemical composition of this steel. 11

12



RYS.3. Drut średnicy 0.76 mm stosowany w zabiegu nefrostomii. FIG.3. Wire with diameter of 0,76 mm used in nephrostomy.

Analizę zawartości węgla przeprowadzono metodą absorpcji w podczerwieni na analizatorze firmy LECO CS–244. Wykazała ona, że drut, z którego wykonana jest sprężyna, zawiera 0,16% C, natomiast zawartość węgla w drucie rdzeniowym wynosi 0,13% C.

Badania właściwości mechanicznych przeprowadzone na maszynie wytrzymałościowej firmy Instron wykazały, że drut rdzeniowy charakteryzuje się wytrzymałością na rozciąganie  $R_m$ =1613 MPa oraz wydłużeniem względnym  $A_{100}$ =2,7%.

#### Drut średnicy 0,76 mm

Drugi poddany badaniom drut długości 1100 mm ma budowę analogiczną do pierwszego. Różni się średnicą, która wynosi 0,76 mm (RYS.3). Natomiast średnice elementów tworzących drut wynoszą odpowiednio:

 średnica drutu okrągłego, z którego wykonana jest sprężyna - 150 μm,

średnica drutu rdzeniowego - 525 µm.

Analiza jakościowa i ilościowa przeprowadzona na skaningowym mikroskopie elektronowym wykazała, że poszczególne części drutu: sprężyna z drutu okrągłego oraz drut rdzeniowy zostały wykonane ze stali chromowo–niklowej. Metoda absorpcji w podczerwieni pozwoliła na stwierdzenie, że drut, z którego została wykonana sprężyna ma zawartość węgla na poziomie 0,08% C, natomiast drut rdzeniowy zawiera 0,10% C.

Badania właściwości mechanicznych wykazały, że drut rdzeniowy charakteryzuje się wytrzymałością na rozciąganie  $R_m$ =1445 MPa oraz wydłużeniem względnym  $A_{100}$ =7,9%.

## Podsumowanie

Sukces w diagnostyce i leczeniu z zastosowaniem nefrostomii zależy w dużej mierze od prawidłowego rozwiązania problemów technologicznych w zakresie wytwarzania narzędzi, instrumentarium, jak również materiałów pomocniczych do zabiegów, w tym drutów prowadzących o żądanych właściwościach użytkowych. Przeprowadzone badania drutów importowanych pozwoliły na ustalenie wymagań, jakimi powinny sprostać druty dla nefrostomii. Po ustaleniu technologicznej plastyczności wybranych stali, podejmowane będą próby opracowania technologii wytwarzania drutów.

#### Wire with diameter of 0.76 mm

The other tested wire was 1100 mm long, its structure was similar to the first one. They differ a far as diameter is concerned – here it equals 0.76 mm (FIG.3.), while diameters of the elements constituting the wire are respectively:

diameter of the round wire of which spring is made - 150 μm,
core wire diameter - 525 μm.

Quantitative and qualitative analysis made on a scanning electron microscope proved that particular parts of the wire: spring made of round wire and core wire, have been made of chromium-nickel steel. Infrared absorption method proved that the content of carbon in the wire the spring has been made of equals 0.08% C, whereas the content of carbon in core wire is 0.10% C.

Testing of mechanical properties proved that core wire is characterised by tensile strength  $R_m$ =1445 MPa and unit elongation A<sub>100</sub>=7.9%.

## Summary

The success in diagnostics and treatment when making use of nephrostomy is to a great extent dependent on properly solved technological problems of manufacturing of tools and instruments, as well as accessories necessary for treatment, including guide wire with required effective characteristics. Carried out tests of imported wire enabled to determine the requirements which wire for nepfrostomy should meet. Once the technological plasticity of chosen steel is established, attempts of development of technology of wire production will be made.

## Piśmiennictwo

## References

 Salagierski M., Burzyński K., Jeromin L.: Przezskórna przetoka nerkowa (PPN). Acta Clinica et Morphologica, Czerwiec 2000 2(9).
 http://www.emedicine.com/med/topic3040.htm z dn. 10.06.2007
 http://www.jestemchory.pl/chapter.via?id=503 z dn. 10.06.2007
 Borkowski A.: Urologia – podręcznik dla studentów medycyny. PZWL, Warszawa 1999.

[5] Zieliński J., Leńko J.: Urologia. Tom 2 – Urologia operacyjna. PZWL, Warszawa 1993.

•••••

# BIOCERAMICZNE WARSTWY KOMPOZYTOWE WYTWARZANE METODĄ HYBRYDOWĄ NA STOPIE Ti6AI4V

Barbara Surowska<sup>1\*</sup>, Jarosław Bieniaś<sup>1</sup>, Tadeusz Wierzchoń<sup>2</sup>, Maciej Ossowski<sup>2</sup>, Magdalena Rokita<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Politechnika Lubelska, Katedra Inżynierii Materiałowej, Lublin
<sup>2</sup> Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej, Warszawa
<sup>3</sup> Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Kraków
\*E-mail: b.surowska@pollub.pl

## [Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 13-15]

## Wprowadzenie

Perspektywiczny i dynamiczny kierunek rozwoju stanowią biomateriały układu metal – warstwy bioceramicze, w szczególności łączące wysokie właściwości fizyczne i mechaniczne stopów tytanu z kształtującą ich aktywność biologiczną warstwą hydroksyapatytu [1,3]. Znaczenie aplikacyjne w wytwarzaniu warstw na biomateriałach znajdują głównie techniki inżynierii powierzchni w tym m.in.: metody natryskiwania cieplnego, metody PVD, CVD oraz metody elektrochemiczne [1,4,5]. Wśród tych metod coraz większą rolę odgrywają warstwy wytwarzane metodami jarzeniowymi oraz metodami zol-żel i elektroforezy [4-6].

W pracy przedstawiono badania mikrostruktury oraz możliwości kształtowania kompozytowych warstw bioceramicznych metodą hybrydową.

## Materiał i metody

Przedmiot badań stanowiły bioceramiczne warstwy kompozytowe na stopie tytanu Ti6Al4VELI (ASTM- grade 5) wytworzone metodą hybrydową łączącą procesy azotowania jarzeniowego, zol-żel i elektroforezy. Na stopie Ti6Al4V metodą azotowania jarzeniowego (temp. 800°C, ciśnienie 4 hPa, czas procesu 3h) wytworzono warstwę TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N), którą następnie dwukrotnie pokryto warstwą SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> techniką zol-żel (obróbka cieplna warstwy w temperaturze 500°C). Warstwę zewnętrzną stanowił hydroksyapatyt (HA) wytworzony metodą elektroforezy. Warstwę wygrzewano w temperaturze 750°C, a grubość regulowano poprzez dobór czasu osadzania i parametrów elektrycznych elektroforezy.

Badania morfologii i mikrostruktury wytworzonych bioceramicznych warstw kompozytowych przeprowadzono z wykorzystaniem elektronowego mikroskopu skaningowego (LEO 1430VP).

## Wyniki

Wytworzone na stopie Ti6Al4V warstwy TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) (RYS.1) charakteryzują się wysoką jednorodnością strukturalną (grubość warstwy ~4 µm; twardość ~1750 HV<sub>0.05</sub>). Warstwy TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) wykonano w ten sposób, że na krawędziach azotowanych próbek rozwinięcie powierzchni jest większe niż na środku (środek R<sub>a</sub>=0,432, krawędź R<sub>a</sub>=0,467). Fakt ten powinien korzystnie wpływać na przyczepność warstwy hydroksyapatytu.

# BIO-CERAMIC COMPOSITE LAYERS ON TI6AI4V ALLOY PRODUCED BY HYBRID METHOD

Barbara Surowska<sup>1\*</sup>, Jarosław Bieniaś<sup>1</sup>, Tadeusz Wierzchoń<sup>2</sup>, Maciej Ossowski<sup>2</sup>, Magdalena Rokita<sup>3</sup>

<sup>1</sup>LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE, LUBLIN, POLAND <sup>2</sup>WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WARSAW, POLAND <sup>3</sup>AGH-UST, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, CRACOW, POLAND \*E-MAIL: B.SUROWSKA@POLLUB.PL

[Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 13-15]

## Introduction

One of the prospective and dynamic trend of development in biomaterials is connected to metal-bio-ceramic layers systems, particularly those which join high physical and mechanical properties of titanium alloys with hydroxyapatite layer, which has a positive effect on their biological activity [1,3]. Surface engineering techniques such as: thermal spraying, PVD, CVD and electrochemical methods [1,4,5], are particularly important when it comes to their application in production of the layers on biomaterials. The layers produced by the glow-discharge, sol-gel and electrophoresis methods [4-6] are becoming increasingly important. The paper presents the study of microstructure and the possibility of designing bio-ceramic composite layers by hybrid method.

## Materials and methods

Bio-ceramic composite layers on Ti6Al4VELI alloy (ASTMgrade 5) produced by hybrid method with the use of glow-discharge nitriding, sol–gel and electrophoresis were the subject of examinations. The TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layer on the alloy was produced by glow-discharge assisted by nitriding in a pure nitrogen atmosphere for 3h at a temperature of 800°C and under 4 hPa pressure. The layer was consequently precovered twice with the SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> sol-gel layer (heat treated at 500°C). The hydroxyapatite (Chema-Elektromet Co, Rzeszów), produced by electrophoresis method, was the final layer. The HA layer was annealed at the temperature of 750°C, moreover, the thickness of the layer was controlled by selecting the depositing time and electric parameters of the electrophoresis process.

The morphology and microstructure of the manufactured bio-ceramic composite layers were studied with the use of scanning electron microscope (LEO 1430VP).

## Results

The TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layer on Ti6Al4V alloy (FIG.1) is characterised by a high structural homogeneity (thickness ~4 µm; microhardness ~1750 HV<sub>0.06</sub>). The edge surface development slightly exceeded the centre surface development in the TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) layer produced by the applied method (centre R<sub>a</sub>=0,432 µm, edge R<sub>a</sub>=0,467 µm). This fact ought to advantageously influence adhesion of the hydroxyapatite layer.

a) Mag = 3.00 KX b) Mg = 3.00 KX WD = 9 mm WD = 9 mm

RYS.1. Topografia powierzchni warstwy azotowanej otrzymanej na stopie Ti6Al4V; (a) na środku próbki, (b) na krawędziach próbki. FIG.1. The surface topography of nitrided layer on

Ti6Al4V alloy; (a) in the centre of specimen, (b) in the edges of specimen.



## RYS.3. Układ kompozytowy stop tytanu / TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) / SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> / hydroksyapatyt. FIG.3. The titanium alloy / TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) / SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> / hydroxyapatite composite system.

Analizując topografię powierzchni układu stop Ti6Al4V/ TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> stwierdzono występowanie mniejszej ilości mikropęknięć na środku próbki (założona mniejsza chropowatość warstwy azotowanej) niż na krawędziach (RYS.2b,c).

Mikrostrukturę warstw SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> wykonanych metodą zol-żel przedstawiono na RYSUNKU 2. Widoczne są liczne mikropęknięcia powstałe na skutek wygrzewania warstw w podwyższonej temperaturze. W przypadku warstw wytworzonych na materiale bazowym - tytanie z podwarstwą TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N), mikrostruktura warstw SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> jest bardziej jednorodna i zwarta (RYS.2b) w porównaniu do warstw wykonanych bezpośrednio na stopie tytanu (RYS.2a).



RYS.2. Topografia powierzchni warstw SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>: (a) na stopie Ti6Al4V, (b) z podwarstwą TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) – środek próbki, (c) TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) – krawędź próbki. FIG.2. The surface topography of SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layers: (a) on the Ti6Al4V alloy, (b) with TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) sublayer - centre of the specimen, (c) TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) – edge of the specimen.

During the analysis of surface topography of the Ti6Al4V alloy/TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> system, smaller quantity of microcracks was observed in the centre of the specimen (smaller roughness of the nitrided layer intended), rather than on the edges (FIG.2b,c).

FIGURE 2 presents the microstructure of SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layer produced by the sol-gel technique. Numerous microcracks have been observed due to the fact that the layers were annealed at high temperatures. In the case of substrate material - titanium with TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N) sublayer, the microstructure of SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> layers is more homogeneous and compact (FIG.2b) in comparison with the layers produced directly on titanium alloy (FIG.2a).

14

Układ kompozytowy stop tytanu/TiN+Ti<sub>2</sub>N+αTi(N)/ SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>/hydroksyapatyt wytworzony metodą hybrydową łączącą procesy azotowania jarzeniowego, metody zol-żel i elektroforezy przedstawiono na RYSUNKU 3. Rozwinięcie powierzchni oraz obecność mikropęknięć w mikrostrukturze warstw (mogących spełniać rolę "szczepień"), może korzystnie wpływać na zwiększenie przyczepności warstwy hydroksyapatytu do materiału podłoża oraz w układzie implant-organizm ludzki. Wytworzona warstwa hydroksapatytu metodą elektroforezy jest jednorodna, cienka i zwarta z widocznymi mikropęknięciami.

Analiza dyfrakcyjna (GID) otrzymanej powłoki hydroksyapatytowej [3] wskazuje na jej słabokrystaliczny bądź amorficzny charakter. Ponadto stwierdzono narastanie hydroksyapatytu na powierzchni próbek w wyniku termostatowania w SBF, potwierdzając osiągnięcie własności bioaktywnych wytworzonych warstw kompozytowych.

## Podsumowanie

Podsumowując można stwierdzić, że prezentowana metoda hybrydowa: azotowania jarzeniowego, metody zol-żel, elektroforezy pozwala na wytworzenie nowej generacji biomateriałów tytanowych o ściśle określonej mikrostrukturze, składzie chemicznym i fazowym oraz topografii powierzchni. Z uwagi na korzystną wysoką bioaktywność, jakość warstw oraz możliwość poprawy właściwości mechanicznych hydroksyapatytu korzystnym jest wytworzenie układu kompozytowego z warstwami przejściowymi TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti. Wydaje się, że modyfikacja materiału bazowego (tytanu) przez wytworzenie warstw kompozytowych TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>/hydroksyapatyt może przyczyniać się do zwiększenia biozgodności oraz aktywności biologicznej w warunkach organizmu ludzkiego.

## Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2006-2009 jako projekt badawczy nr 3T08C05430.

# Piśmiennictwo

[1] Liu X., Chu P.K., Ding Ch. Materials Science and Engineering R 47 (2004), pp. 49-121.

[2] Montenero A., Gnappi G., Ferrari F., Cesari M., Salvioli E., Mattogno L., Kaciulis S., Fini M.; Journal of Materials Science 35 (2000), pp. 2791-2797.

[3] Rokita M., Stoch A., Adamczyk A., Długoń E., Brożek A.; Engineering of Biomaterials 58-60 (2006), pp. 187-190. FIGURE 3 presents the titanium alloy/TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>/hydroxyapatite composite system, produced by the hybrid method combining glow-discharge nitriding, sol–gel and electrophoresis methods.

The surface development and presence of microcracks in the microstructure of the layers (playing the role of "mechanical interlooking"), may positively influence on increase of adhesion of the hydroxyapatite layer to the substrate material and, therefore, implants applied in human organisms. The hydroxyapatite layer produced by the electrophoresis method was homogeneous, thin and compact with the visible microcracks.

The XRD analysis of the hydroxyapatite layer (GID method) showed their fine-crystallinity or the amorphous character [3]. Moreover, a growth of hydroxyapatite was observed on the specimen surface, as a result of soaking in SBF at a specific temperature. This confirms obtaining bioactive properties by the composite layers.

## Summary

To sum up, the application of a hybrid method: glowdischarge nitriding, sol–gel and electrophoresis allows us to manufacture a new generation of titanium biomaterials with the definite microstructure, phase and chemical composition and surface topography. Taking into consideration high bioactivity, layer quality and possibility of improving the mechanical properties of hydroxyapatite, it is advantageous to produce composite systems with TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti intermediate layers.

It seems that modifications of the substrate material (titanium) through the production of TiN+Ti<sub>2</sub>N+ $\alpha$ Ti(N)/SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>/hydroxyapatite may cause an increase of biocompatibility and biological activity in human organisms.

## Acknowledgements

. . . . . . . . . . . . . . .

This work was supported by Ministry of Science and Higher Education: grant 3T08C05430.

## References

[4] StochA., BrożekA., Kmita G., Stoch J., Jastrzębski W., RakowskaA.; Journal of Molecular Structure 596 (2001), pp. 191-200.
[5] Wierzchoń T.; Surface and Coatings Technology 180-181 (2004), pp. 458-464.

[6] Surowska B., Bieniaś J., Walczak M., Sangwal K., Stoch A.; Applied Surface Science 238 (2004), pp. 288–294. 16

# BIOSZKŁO NOWEJ GENERACJI JAKO SKŁADNIK KOMPOZYTU Z HYDROKSYAPATYTEM

J. Kokoszka, A. Onyszkiewicz, K. Szymańska, K.J. Bramowska, K. Cholewa-Kowalska, A. Ślósarczyk, M. Łączka

Akademia Górniczo – Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków

## Streszczenie

Celem badań było wytworzenie kompozytu hydroksyapatyt – bioszkło nowej generacji. Badaniom poddano kompozyty o różnej zawartości bioszkła S2: 2,5%, 5%, 10%, 25% oraz 50%, w których resztę składu procentowego stanowił hydroksyapatyt.

Otrzymane próbki zostały scharakteryzowane ze względu na skład fazowy, a w celu oceny bioaktywności przeprowadzono badania in vitro w sztucznym osoczu (SBF).

Wykorzystując scanningową mikroskopię elektronową oceniono stan powierzchni materiałów po 7 i 14 dniach inkubacji w sztucznym osoczu (SBF). [Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 16-18]

Wprowadzenie

Ważną rolę wśród nowoczesnych materiałów implantacyjnych odgrywają materiały bioaktywne zdolne do wytwarzania z żywymi tkankami trwałego chemicznie połączenia. Do grupy tych materiałów zalicza się ceramikę na bazie fosforanów wapnia oraz bioszkło. Samodzielne stosowanie tych materiałów nie jest powszechne w implantacji ze względu na ich niską odporność na kruche pękanie. Dlatego też poszukuje się skutecznych połączeń tych materiałów.

W pracy przedstawiono sposób wytworzenia kompozytu składającego się z hydroksyapatytu oraz bioszkła nowej generacji oraz przeanalizowano proces narastania apatytu w symulowanym osoczu ludzkim (SBF) na powierzchni tych materiałów po 7 i 14 dniach inkubacji.

# Materiały i metody

Badaniom zostały poddane kompozyty wykonane z hydroksyapatytu oraz bioszkła pochodzenia żelowego o różnym składzie chemicznym. Wykonano serię próbek kompozytu o zawartości bioszkła 2,5%, 5%, 10%, 25% oraz 50%. Skład procentowy kompozytów oraz warunki obróbki termicznej podano w TABELI 1.

Wykorzystano bioszkło S2 wytworzone za pomocą syn-

tezy zol-żel, o wysokiej zawartości krzemionki (80% mol. SiO<sub>2</sub>, 16% mol. CaO, 4% mol.  $P_2O_5$ ).

Składniki kompozytu poddano 24-godzinnemu mieszaniu w środowisku alkoholu propylowego, a następnie poddano suszeniu w temperaturze 100°C. Z otrzymanego materiału wytworzono pastylki metodą prasowania jednoosiowego pod ciśnieniem 100 MPa. Spiekanie pastylek przeprowadzono w temperaturach od 700°C – 1300°C.

Skład procentowy kompozytu / Percentage composition of the composite	Temperatury spiekania Sintering temperatures
2.5% S2 / 97.5% HAp 5% S2 / 95% HAp 10% S2 / 90% HAp	700 – 1100°C
25% S2 / 75% HAp 50% S2 / 50% HAp	900 – 1300°C

TABLE 1. Skład procentowy kompozytu oraz temperatury spiekania. TABLE 1. Percentage composition of the

composite and sintering temperatures.

# NEW GENERATION BIOGLASS AS A COMPONENT OF HYDROXYAPATITE COMPOSITE

J. Kokoszka, A. Onyszkiewicz, K. Szymańska, K.J. Bramowska, K. Cholewa-Kowalska, A. Ślósarczyk, M. Łączka

AGH - University of Science and Technology, Faculty of Materials Science and Ceramics, 30, Mickiewicz Al., 30-059 Cracow, Poland

# Abstract

The aim of this study was to fabricate a new generation bio-glass / hydroxyapatite composite.

Bioceramic composites were synthesized by sintering the powders of hydroxyapatite (HAp) mixed directly with an additive of 2.5, 5, 10, 25 and 50 wt.% bio-glass, at different temperatures ranging from 700 to 1300°C.

The obtained materials were characterised with respect to phase composition and SBF test for estimation of their bioactive properties was carried out.

The surfaces of composites were investigated as a function of soaking time in simulated body fluid (SBF) after 7 and 14 days, using SEM/EDAX analysis.

[Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 16-18]

# Introduction

Bioactive materials are a very important group of modern implants, which can create the stable connection with living organism tissues. These materials are calcium phosphates and bio-glass based ceramics. In practice, because of their low fracture toughness, these materials are used only in none load bearing places.

In this work powders of HAp and silicate – based glass (80% SiO<sub>2</sub>, 16% CaO, 4%  $P_2O_5$ ; S2), prepared by the sol–gel method, were sintered at different temperatures ranging from 700 to 1300°C.

Based on scanning electron microscope examinations, the surface of investigated materials after different times of incubation in SBF was observed.

# Materials and methods

In the present study, HAp composites containing: 2.5, 5, 10, 25 and 50 wt.% bioglass additions, were investigated over a range of sintering temperatures, to determine their phase composition and microstructure. The percentage chemical composition of the composites and temperature treatment conditions are summarized in TABLE 1.

Using the sol-gel method, the S2 powder (high silica glass 80% mol. SiO<sub>2</sub>, 16% mol. CaO, 4% mol.  $P_2O_5$ ) was prepared.

The HAp and S2 powders were prepared by wet ball – milling in isopropyl alcohol, for 24 hours, and then dried at 100°C. Discshaped samples were pressed uni-axially at 100 MPa. The obtain samples were sintered at temperatures of 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200 and 1300°C. Otrzymane próbki zostały scharakteryzowane pod względem składu fazowego, a także w celu oceny bioaktywności przeprowadzono badania *in vivo* w sztucznym osoczu (SBF).

# Wyniki badań

Na podstawie dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) oraz badań w podczerwieni (FTIR) wywnioskowano, iż w temperaturach powyżej 1100°C zachodzi krystalizacja bioszkła w kierunku krzemianów wapnia, a także następuje rozkład hydroksyapatytu do fosforanu wapnia (RYS.1).

Otrzymane spieki poddane zostały badaniu w symulowanym płynie fizjologicznym SBF w celu określenia stopnia bioaktywności. Dla próbek o okresie inkubacji 7 i 14 dni przeprowadzone zostały badania SEM/EDAX. The HAp/S2 powders and the sintered samples were characterized by X-ray diffraction (XRD) and a scanning electron microscope coupled with energy dispersive X-ray analysis (SEM/EDAX). *In vitro* assay was performed by soaking the disks in the simulated body fluid during a period of 7 and 14 days.

## Results

Based on results of XRD and FTIR analysis we can conclude that phase composition of sintered composites at temperatures up to 1100°C, were calcium silicate being probably a product of bio-glass recrystallization, and calcium phosphate - decomposition of HAp. XRD patterns and FTIR spectra of the 50% HAp / 50% S2 composite sintered at 1300°C are shown in FIG.1.



RYS.1. Charakterystyka XRD oraz analiza FTIR kompozytu 50% HAp / 50% S2 dla 1300°C. FIG.1. XRD characteristics and FTIR analysis of the composite 50% HAp / 50% S2 at 1300°C.



RYS.2. Mikroskopowy obraz powierzchni SEM oraz analiza EDAX materiału kompozytowego 50% S2 / 50% HAp wypalanego w 1300°C przed inkubacją w SBF.

FIG.2. Microscope photo (SEM) and EDAX analysis of the surface 50% S2 / 50% HAp composite material sintered at temperature of 1300°C before incubation in SBF.

BI MATERIALS



RYS.3. Mikroskopowy obraz powierzchni SEM oraz analiza EDAX materiału kompozytowego 50% S2 / 50% HAp wypalanego w 1300°C po 14 dniach w SBF.

FIG.3. Microscope photo (SEM) and EDAX analysis of composite material 50% S2 / 50% HAp sintered at the temperature of 1300°C after 14 days in SBF.

Morfologia powierzchni próbki oraz analiza składu dla próbki kompozytu 50% S2 / 50% HAp przed oraz po 14 dniach inkubacji w SBF przedstawione są na RYS.2 i 3.

Na podstawie tej analizy zaobserwowano znaczny wzrost stężenia wapnia i fosforu przy obniżeniu/zaniku refleksu charakterystycznego dla krzemu, co może świadczyć o formowaniu się na powierzchni materiału warstwy fosforanu wapnia.

Opierając się na wynikach wcześniejszych badań [5], a także biorąc pod uwagę charakterystyczną morfologię tworzącej się warstwy powierzchniowej (kuliste, "kalafiorowate" formy) można przypuszczać, że warstwę tę stanowi hydroksyapatyt.

## Wnioski

1. Bioszkło nowej generacji SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> może być właściwym materiałem wyjściowym do produkcji kompozytów z hydroksyapatytem.

2. Skład fazowy spieków wskazywał na przekrystalizowanie bioszkła oraz rozkład hydroksyapatytu, zwłaszcza w temperaturach powyżej 1100°C.

3. Badania przeprowadzone w SBF oraz analiza SEM/ EDAX wykazały, iż na powierzchni kompozytu narasta warstwa fosforanów wapnia, co jednocześnie wskazuje na ich bioaktywność.

# Podziękowania

Praca finansowana z działalności statutowej WIMiCAGH. Projekt nr 11.11.160.365/2008.

# Piśmiennictwo

[1] Kokubo T.T.: Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. J. Non-Cryst. Sol. 120 (1990) 290-296.

[2] Li P., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N., de Groot K.: Introduction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids, on sol-gel prepared silica. Biomaterials, 14, (1993) 963-968.

[3] A. Ślósarczyk: Bioceramika hydroksyapatytowa; Ceramika 51, Polski Biuletyn Ceramiczny 13; Polskie Towarzystwo Ceramiczne, Kraków 1997. The HAp/S2 composites were examined using SEM/ EDAX analysis after soaking in simulated body fluid (SBF) for 7 and 14 days.

SEM observation and EDAX analysis of the 50% HAp / 50% S2 composite before and after 14 days contact with SBF are shown in FIG.2 and 3. The examination proved that after 14 days contact with SBF, Ca and P peaks increased, with rapid drop of Si peak. This observation suggests that hydroxyapatite was probably formed on the surface of the sample as a result of being immersed in the simulated body fluid.

## Conclusions

1. Bioglass of new generation  $SiO_2$ -CaO- $P_2O_5$  can be used as initial materials for obtaining HAp/S2 composites.

2. Phase composition of sinters indicates for bio-glass recrystallization and decomposition of hydroxyapatite, particularly at the temperature of 1100°C.

3. The studies in SBF and SEM/EDAX analysis probed that a coat of calcium phosphate grows at the composite surface, what also indicates their high bioactivity.

# Acknowledgements

This investigation was financially supported by the Faculty of Mat. Science and Ceramics, AGH, under project No 11.11.160.365/2008.

# References

[4] C.C. Tancred, A.J. Carr, A.A.O. Mccormack: The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with bioglass additions; Journal of materials science: Materials in medicine 12 (2001) 81-93.

[5] R. Sindut: "Bioszkła nowej generacji – wpływ parametrów materiałowych na bioaktywność" rozprawa doktorska, AGH Kraków 2006.



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

STANISŁAW PIELKA<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAŚ<sup>2</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWICKA<sup>1</sup>, DANUTA PALUCH<sup>1</sup>, STANISŁAW TRACZYK<sup>2</sup>, WOJCIECH BERENDT<sup>1</sup>, LESZEK SOLSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU, ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW, 50-326 WROCŁAW, UL. PONIATOWSKIEGO 2 <sup>2</sup> INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI, 02-676 WARSZAWA, UL. POSTEPU 9 \*E-MAIL: SEKR@CHEKSP.AM.WROC.PL

## Streszczenie

Celem badań była ocena biologiczna zmodyfikowanych cementów opartych na fosforanie wapnia, w formie litych walców, przeznaczonych do uzupełniania ubytków kości. Badaniu poddano trzy rodzaje materiałów, oznaczonych roboczo symbolami B, H i K-0,25 alg, o następujących składach komponentów proszkowych: B - aTCP, DCP, DCPD; H - aTCP, HA; K-0,25 alg - αTCP, βTCP, DCPD, alginian sodu. Przeprowadzono badania cytotoksyczności oraz odczynu tkanki kostnej na obecność tych materiałów. Okres obserwacji po wszczepieniu kompozytów w formie litych walców do krętarzy kości udowej królików wynosił 1, 2 i 3 miesiące. W badaniach histologicznych stwierdzono, że w bezpośrednim sąsiedztwie implantów, do 2 miesiąca po wszczepieniu, obecna była faza wysiękowa. Wszczepy otaczało pasmo tkanki łącznej i kostnej częściowo wnikającej w strukturę implantu. W 3 miesiącu obserwacji ulegające częściowej defragmentacji cementy otaczała splotowata i blaszkowata tkanka kostna z wyspami tkanki łącznej. Implanty ulegały stopniowej resorpcji od strony brzeżnej. Przeprowadzone badania mikroskopowe wykazały, że resorpcja cementu i procesy regeneracyjne tkanki kostnej były intensywniejsze w przypadku cementu zawierającego alginian sodu w porównaniu do cementów nie zawierających alginianu. Słowa kluczowe: biomateriały, cementy, fosforan wapnia, badania eksperymentalne, biozgodność [Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 19-23]

## Wprowadzenie

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

# **BIOLOGICAL PROPERTIES OF** SOLID CALCIUM PHOSPHATE **CEMENT IMPLANTS WITH** ADDITION OF SODIUM ALGINATE. **EXPERIMENTAL COMPARATIVE STUDIES**

STANISŁAW PIELKA<sup>1\*</sup>, JOANNA KARAŚ<sup>2</sup>, BOGUSŁAWA ŻYWICKA<sup>1</sup>, DANUTA PALUCH<sup>1</sup>, STANISŁAW TRACZYK<sup>2</sup>, WOJCIECH BERENDT<sup>1</sup>, LESZEK SOLSKI1

<sup>1</sup>WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIAL RESEARCH, 2, PONIATOWSKIEGO STR., 50-326 WROCLAW, POLAND <sup>2</sup> INSTITUTE OF GLASS AND CERAMIC, 9, POSTEPU STR., 02-676 WARSAW, POLAND \*E-MAIL: SEKR@CHEKSP.AM.WROC.PL

# Abstract

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

Keywords: biomaterials, cements, calcium phosphate, experimental studies, biocompatibility [Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 19-23]

## Introduction

There is a demand in bone surgery for synthetic materials with high osteoconductive properties [1,2]. Recently much time has been devoted to the studies on calcium phosphate cements, which have exceptionally beneficial biological properties. However the cements are characterized by a relatively low mechanical strength, especially shortly after implantation [2]. Also, many calcium phosphate cements undergo disintegration after contact with blood or other systemic fluids, what limits their applicability in clinical procedures. Laboratory experiments show that the addition of sodium alginate may enhance cohesion of the cement [3]. Alginic acid sodium salt (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>) is a natural polysaccharide produced from seaweed from Phaeophyceae family (Macrocystis pyrifera, Laminaria digitata, L. cloustoni, Ascophyllum nodosum).

Sól sodowa kwasu alginowego (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>) stanowi naturalny polisacharyd, wytwarzany z wodorostów rodziny Phaeophyceae (Macrocystis pyrifera, Laminaria digitata, L. cloustoni, Ascophyllum nodosum). Wielkość jego wpływu na wytrzymałość mechaniczną cementów fosforanowowapniowych zależna jest od zastosowanego stężenia. Zbyt wysokie może prowadzić do zahamowania procesu wiązania cementu [4]. Oddziaływanie biologiczne algianianu sodu jest znane i akceptowane. Jest on stosowany między innymi w technologiach żywieniowych, jako dodatek nośników leków, a także jako biomateriał. W Instytucie Szkła i Ceramiki w Warszawie przygotowano trzy rodzaje kompozytowych cementów opartych na fosforanach wapnia (skład podano w następnym rozdziale). Oznaczone B i H wykazywały trwałość w kontakcie z płynami tkankowymi. Natomiast cement K (bez dodatku alginianu) sodu w kontakcie z krwią ulegał powolnemu rozmiękaniu. Integralność struktury cementu K uzyskano po modyfikacji jego składu wyjściowego przez zastosowanie dodatku alginianu do proszku w ilości 0,25% wag. (materiał oznaczony K-0,25 alg). Ponieważ nieznane były oddziaływania biologiczne tak przygotowanych kompozytów, celem badań była ocena oddziaływania cytotoksycznego oraz porównawcza ocena odczynów żywej tkanki kostnej na obecność wyżej wymie-

nionych materiałów, w formie litych walców.

## Materiał i metody

Badano trzy rodzaje ceramicznych zmodyfikowanych cementów wapniowofosforanowych oznaczonych H i B i K-0,25 alg z suplementacją alginianu z udziałem następujących fosforanów:  $\alpha$ TCP lub  $\beta$ TCP ( $\alpha$ lub  $\beta$  fosforan trójwapniowy Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), DCP (wodorofosforan (V) wapnia CaHPO<sub>4</sub>) lub DCPD (wodorofosforan (V) wapnia dihydrat, CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) (TABELA 1).

Próbki cementów przeznaczone do badań cytotoksyczności miały formę krążków (10mm x 1,5mm), natomiast przygotowane do

wszczepienia do tkanek - formę litych walców (3mm x 10mm). Cementy poddano sterylizacji radiacyjnej.

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

#### Ocena cytotoksyczności

Badania cytotoksyczności przeprowadzono metodą bezpośredniego kontaktu próbek cementów z jednowarstwowa hodowlą komórek fibroblastów mysich 3T3/Balb. Badania cytotoksyczności wykonano zgodnie z PN-EN ISO 10993 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro". Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodowlanym Eagle'a z dodatkiem 10% inaktywowanej (30 min., 56°C) surowicy cielęcej oraz 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2 mM/ml L-glutaminy w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO2. Komórki przeszczepiano stosując roztwór 0,05% trypsyny z 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2. Hodowla komórek fibroblastów mysich została założona na płytkach Petriego w ilości 0,5·106 na każdej. Po 24 godzinach na hodowle komórkowe nakładano próbki materiałów i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO2. Stopień toksyczności badanych cementów oceniono na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji.

### Badania implantacyjne

Badania przeprowadzono na 27 królikach rasy nowozelandzkiej. Po domięśniowym znieczuleniu wykonywano cięcie skóry wzdłuż nasady kości udowej i w odsłoniętych Its influence on the mechanical strength of calcium phosphate cements depends on its concentration. Too high concentration may lead to the inhibition of cement setting [4]. Biological effects of sodium alginate are known and accepted. It is used, among others, in food technology, as a vehicle for drugs, and also as a biomaterial. Three forms of composite calcium phosphate cements were developed at the Institute of Glass and Ceramics (ISiC) in Warsaw (their composition is given in the next chapter). Those denominated as B and H were stable in contact with systemic fluids. On the other hand, cement K (without the addition of sodium alginate) displayed slow softening in contact with blood. The integrity of cement K structure was obtained after modification of its initial composition with the addition of alginate to the powder in the amount of 0.25% of weight (material denominated K-0.25 alg). Since the biological effects of thus prepared composites were unknown, the aim of the study was to evaluate the cytotoxic effect and to assess comparatively the reaction of live bone tissue to the presence of the above described materials in the form of solid cylinders.

## Material and methods

The investigations involved three kinds of modified

Symbol cementu / Symbol of the cement	Prosz % wa Powder	zek, g. / ; wt%	Płyn / Fluid
В	αTCP DCP DCPD	90.1 6.6 3.3	roztwór bursztynianu sodu 12% wag. / 12 wt% sodium succinate solution
Н	αTCP HA	98.0 2.0	roztwór Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3% wag./ 3 wt% Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> solution
K-0,25 alg	αTCP βTCP DCPD alginian sodu	77.80 16.96 4.99 0.25	roztwór bursztynianu sodu 12% wag. / 12 wt% sodium succinate solution

TABELA 1. Skład badanych cementów wapniowo-fosforanowych. TABLE 1. Composition of the investigated calcium-phosphate cements. ceramic calcium phosphate cements designated H, B and K-0.25 alg with alginate supplementation with the following composition of powder components:  $\alpha$ TCP or  $\beta$ TCP ( $\alpha$  or  $\beta$  tricalcium phosphate -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), DCP (calcium hydrogen phosphate - CaHPO<sub>4</sub>) or DCPD (calcium hydrogen phosphate dihydrate -CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) (TAB.1).

Samples of cement for cytotoxicity examination were prepared in the shape of circles (10mm x 1,5mm), while those prepared for implantation were

solid cylinders (3mm x 10mm). The cements were submitted to radiation sterilization.

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

#### Cytotoxicity evaluation

Cytotoxicity evaluation involved immediate contact of the samples with single-layer culture of mice fibroblast 3T3/Balb. Cytotoxicity examinations were performed according to PN-EN ISO 10993 "Biological evaluation of medical products. Part 5: In vitro cytotoxicity". Cells were cultured in Eagle's medium with 10% addition of inactivated (30 min., 56°C) calf serum and 100 u/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin and 2 mM/ml L-glutamine at 37°C, in atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The cells were transplanted using solution of 0.05% trypsin with 0.02% EDTA in PBS, pH 7.2. Mice fibroblasts culture was performed on Petri dishes in the amount of 0.5.106 for each dish. After 24 hours, cell cultures were covered by samples of material and incubated at 37°C in air containing 5% CO2. The degree of toxicity of the investigated cements was assessed on the basis of pathological changes in the cells, their survival and capability to proliferate.

### Implantation examinations

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

ш

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

Wyniki

## Ocena cytotoksyczności

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

## Badania implantacyjne

W czasie obserwacji pooperacyjnych zwierzęta zachowały czynną

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

## Badania makroskopowe

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

W narządach wewnętrznych nie znaleziono zmian o charakterze patologicznym.

## Badania histologiczne

#### cement B

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

·/ er	ոia / of [h]	Sy	mbol of	the inv	estigat	ed cem	, ent	
Parametr Paramete	Czas badar Duration examinatior	Cement K–0.25 alg	Kontrola / Control	Cement B	Kontrola / Control	Cement H	Kontrola / Control	
y czne / gical	24	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
imian ologic oholo hange	48	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
Z morfa Morp	72	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	
órek / ity ]	24	0,76± 0,08	0,82± 0,02	0,82± 0,026	0,76± 0,03	0,84± 0,026 #	0,76± 0,03	
ść kom Is dens nI x 10 <sup>6</sup>	48	1,46± 0,09	1,36± 0,02	1,46± 0,314	1,28± 0,23	1,38± 0,243	1,28± 0,230	
Gęstos Cell [n	72	2,42± 0,07	2,2± 0,15	2,46± 0,307	2,1± 0,353	2,50± 0,360	2,1± 0,353	
rki 'e / ells	24	0	0	0	0	0	0	
omó artw ad c [%]	48	0	0	0	0	0	0	
Ϋ́E Β	72	1	1	1	3	1	3	
h ości/ ty	24	0	0	0	0	0	0	
stopie syczn oxici	48	0	0	0	0	0	0	
toks toks	72	0	0	0	0	0	0	
TARELA 2 Wyniki badań cytotoksycz								

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

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

### Results

## Cytotoxicity evaluation

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

#### Implantation examinations

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

#### Macroscopic examinations

The macroscopic picture after implantation of all the investigated cements was similar. Following soft tissues preparation, the lesser and greater trochanters of the femoral bone were exposed and they were found to be of normal size and colour. One month after the surgery, the implantation sites were partly covered with periosteum. Two and three months after the operation the implants were less visible; they were completely covered with periosteum and fused firmly with the surrounding bone. Transverse sections of the femoral bones revealed maintained cylindrical shape of the implants until the third month, with merely the presence of transverse cracking. Internal organs did not reveal any pathological changes.

#### **Histological examinations**

## cement B

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

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

#### cement H

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

## cement K-0,25 alg

W gąbczastej tkance kostnej, w 1 miesiącu po operacji, widoczne były pofragmentowane wszczepy przerośnięte i otoczone tkanką kostną i łączną. W szpiku kostnym obecne były pozostałosci fazy wysiękowej, liczne cienkościenne naczynia krwionośne. W 2 miesiącu obserwacji widoczne były implanty otoczone pasem nowowytworzonej tkanki kostnej o cechach tkanki kostnej blaszkowatej oraz tkanki łącznej wnikającej w formie wypustek w przestrzeń wszczepu. 3 miesiące po implantacji, w preparatach barwionych HE widoczne były pomniejszone wszczepy tkwiące tkance kostnej blaszkowatej, ograniczone w pojedynczych wypadkach wąskimi i nielicznymi wysepkami tkanki łącznej. Z dala od centralnego wszczepu w tkance kostnej znajdowano fragmenty tworzywa otoczone tkanką kostną. Cement był wyspowo obecny w szpiku kostnym, otoczony tkanka chrzęstną lub blaszkowatą tkanką kostną. In immediate surrounding there were homogenously staining remains of the exudative phase, aggregation of inflammatory cells and thin-walled blood vessels. The bone tissue surrounding the implant contained numerous osteoblasts and fragments of the material. In the second month, the cements were surrounded with a layer of bone tissue and fibrous tissue in places. This layer contained remains of exudates in the form of homogenously staining mass, aggregation of inflammatory cells and strongly marked osteoblasts activity. In some places single narrow bands of bone and connective tissues penetrated the structure of the implant on the whole width. From the side of bone marrow the implant was separated with a layer of connective tissue with the foci of ossification. Three months after implantation, the histological preparations contained fragmented cements surrounded with overgrown bone tissue. Proliferation of fibrous tissue was observed in places.

#### cement H

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

#### cement K-0.25 alg

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

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



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

FIG.1. Microscopic view of solid calcium phosphate implants imapanted to bone tissue in 3 months observation. (A) cement K-alg (H&E,560x), B) cement B (H&E,560x), C) cement H (H&E,560x).

## Podsumowanie

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

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

# Wnioski

1. Wytworzone cementy oparte na fosforanach wapnia nie wywoływały efektu cytotoksycznego.

2. Wszystkie badane cementy oznaczone symbolami B, H i K-alg, ulegały w żywych tkankach częściowej biodegradacji i fragmentacji. Proces ten był najbardziej nasilony w 3 miesiącu po wszczepieniu do kości.

3. W 2 miesiącu po miesiącu po wszczepieniu do kości, wokół i wewnątrz pofragmentowanych wszczepów tworzyła się blaszkowata tkanka kostna.

4. Wszystkie trzy badane materiały charakteryzowała wysoka biozgodność. Proces osteokondukcji najszybciej przebiegał po implantacji K-alg, zawierającego dodatek alginianu sodu.

# Piśmiennictwo

[1] dos Santos LA, De Oliveria LC, Rigo EC, Carrodeguas RG, Boschi AO, De Arruda AC: Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. Bone. 1999 Aug;25(2 Suppl):99S-102S.

[2] Pielka S, Woźny W, Żywicka B, Paluch D, Solski L, Karaś J.: The biocompatibility of the composite of porous ceramic corundum with polyvinyl alcohol dripped with vancomycin. Inter. Conf. "Biomaterials in regenerative medicine". Vienna, October 22-25, 2006.; s.69, P-36.

## Resume

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

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

# Conclusions

1. Calcium phosphate cements did not produce any cytotoxic effect.

2. All the investigated cements, denominated as B, H and K-alg, underwent partial biodegradation and fragmentation in the live tissue. The process was most pronounced 3 months after their implantation to the bone.

 Lamellar bone tissue was formed around and inside fragmented implants two months after cement implantation.
 All three investigated cements were characterized by high biocompatibility. The process of osteoconductivity was the quickest in the case of cement K-alg containing sodium alginate.

# References

[3] Khairoun I, Driessens FC, Boltong MG, Planell JA, Wenz R: Addition of cohesion promotors to calcium phosphate cements. Biomaterials. 1999 Feb;20(4):393-8.

[4] Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M, Nagayama M, Asaoka K. Nondecay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. Biomaterials. 1995 May;16(7):527-32.

[5] Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, Ryoke K. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. Biomaterials. 2002 May;23(9):2027-33.

# WARTOŚĆ BIOLOGICZNA WSZCZEPÓW CEMENTU WAPNIO-WO-FOSFORANOWEGO, APLIKOWANYCH INIEKCYJNIE DO UBYTKÓW KOŚCI, W BADANIACH EKSPERYMENTALNYCH

Stanisław Pielka<sup>1\*</sup>, Joanna Karaś<sup>2</sup>, Bogusława Żywicka<sup>1</sup>, Danuta Paluch<sup>1</sup>, Stanisław Traczyk<sup>2</sup>, Wojciech Berendt<sup>1</sup>, Leszek Solski<sup>1</sup>

 <sup>1</sup> Akademia Medyczna we Wrocławiu, Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, 50-326 Wrocław, ul. Poniatowskiego 2
 <sup>2</sup> Instytut Szkła i Ceramiki, 02-676 Warszawa, ul. Postępu 9
 \*E-mail: sekr@cheksp.am.wroc.pl

## Streszczenie

Nieregularne ubytki kości, zwłaszcza umiejscowione w głębi kości, są trudne do uzupełnienia materiałami litymi bez usunięcia zdrowej tkanki ponad ubytkiem. Odpowiednim materiałem mogłaby być resorbowalna ceramika w postaci płynnej.

W tym celu opracowano w Instytucie Szkła i Ceramiki (ISiC) trzy postacie cementów wapniowo-fosforanowych mogących być wszczepianymi iniekcyjnie. Komponenty proszkowe tych cementów zawierały α-TCP i/lub β-TCP i/lub DCP i/lub DCPD i/lub i/lub HA i/lub alginian sodu. Proszki zarabiane roztworami wodnymi 12% wag. bursztynianu sodu lub 1-3% wag. Na2HPO4 miały półpłynną postać, możliwą do implantacji metodą iniekcji za pomocą strzykawki lekarskiej i igły iniekcyjnej do wytworzonych ubytków w kości udowej królików. Okres obserwacji wynosił 1, 2 i 3 miesiące. W badaniach histologicznych obserwowano w pierwszym miesiącu po wszczepieniu obecność fazy wysiękowej w tkance bezpośrednio przylegającej do wszczepu, która ustępowała w drugim miesiącu po wszczepieniu. Ulegające biodegradacji cementy otoczone były cienkimi pasmami włóknistej tkanki łącznej oraz tkanki kostnej splotowatej, które wnikały w strukturę wszczepu. W 3 miesiącu częściowo zresorbowane i pofragmentowane wszczepy otaczała i przerastała głównie splotowata i blaszkowata tkanka kostna z wyspami tkanki łącznej. Najszybciej procesy resorbcji wszczepu i regeneracji kości przebiegały po wszczepieniu cementu zawierającego alginian sodu. Badania eksperymentalne wykazały, że wszystkie trzy rodzaje cementów wapniowo-fosforanowych są biozgodne, wykazują cechy osteoindukcji i osteokondukcji. Ich płynna forma umożliwia łatwe i szczelne wypełnianie nieregularnych lub głęboko w kości położonych ubytków. Słowa kluczowe: cement fosforanowo-wapniowy, wszczep aplikowany iniekcyjnie, badania eksperymentalne, biozgodność

[Inżynieria Biomateriałów, 73, (2008), 24-28]

# Wstęp

Naprawcze operacje w chirurgii kostnej, jak również innych tkanek, powinny w najmniejszym stopniu uszkadzać tkanki zdrowe. W przypadku ubytku tkanki kostnej, uzupełnienie wszczepem litym zawsze wymaga mniejszej lub

# EXPERIMENTAL STUDIES OF BIOLOGICAL EVALUATION OF CALCIUM PHOSPHATE CEMENT IMPLANTS INJECTED TO BONE TISSUE

Stanisław Pielka<sup>1\*</sup>, Joanna Karaś<sup>2</sup>, Bogusława Żywicka<sup>1</sup>, Danuta Paluch<sup>1</sup>, Stanisław Traczyk<sup>2</sup>, Wojciech Berendt<sup>1</sup>, Leszek Solski<sup>1</sup>

<sup>1</sup> WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY,

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIAL RESEARCH,

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

 $^2\,\text{Institute}$  of GLass and Ceramic,

- 9, POSTEPU STR., 02-676 WARSAW, POLAND
- \*E-MAIL: SEKR@CHEKSP.AM.WROC.PL

## Abstract

Irregular bone loss, especially situated deeply inside the bone, cannot be easily filled with solid materials without removal of healthy bone tissue from above the loss. Thus resorbable liquid ceramic material could be a good alternative.

For this reason, three forms of injectable calcium phosphate cements have been developed at the Institute of Glass and Ceramics (ISiC). Powder components of the cements contained  $\alpha$ -TCP and/or  $\beta$ -TCP and/or DCP and/or DCPD and/or HA and/or sodium alginate. The powders, mixed with aqueous solutions of 12 wt.% sodium succinate or 1-3 wt.% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, had a semi-liquid form that could be applied by means of injection with a medical syringe and an injection needle to the site of bone loss in the rabbits' femur. The follow up period was 1, 2 and 3 months. Histological examinations one month after the injection revealed the presence of exudates in the tissue adjoining the implant, which disappeared two months after the injection. Undergoing biodegradation cements were surrounded by a thin layer of fibrous tissue and plexiform bone tissue, which penetrated the structure of the implant. In the third month, partly resorbed and fragmented implants were surrounded and overgrown mainly with plexiform and lamellar bone tissue with islands of connective tissue. The processes of implant resorption and bone regeneration were the quickest in the case of cement containing sodium alginate. The experimental studies have shown that all three kinds of calcium phosphate cement are biocompatible and reveal features of osteoinduction and osteoconduction. The liquid form enables easy and tight filling of irregular or deep-seated bone loss.

Keywords: calcium phosphate cement, implants injected, experimental studies, biocompatibility [Engineering of Biomaterials, 73, (2008), 24-28]

## Introduction

Reconstructive operations in bone surgery, as well as other tissues surgery, should aim at minimal destruction of healthy tissue. In the case of bone loss, solid implant filling always requires some destruction of the adjoining healthy tissue in order to adjust the shape of the implant to the shape of the loss or to seat the implant in the loss situated inside the bone. większej destrukcji sąsiadującej z ubytkiem tkanki zdrowej, celem wzajemnego dopasowania kształtu wszczepu i kształtu ubytku lub osadzenia wszczepu w ubytku znajdującym się wewnątrz kości. Warunkiem dobrej integracji wszczepu i tkanki jest ścisły kontakt materiału na dużej powierzchni z żywą tkanką. Nowym materiałem, potencjalnie spełniającym powyższe warunki, może być cement fosforanowo-wapniowy w formie płynnej. Wprowadzony do ubytku kości o nieregularnym kształcie szczelnie wypełniałyby go bez konieczności dodatkowego kształtowania miejsca biorczego.

Cementy oparte na fosforanach wapnia, po związaniu proszku z fazą płynną, ulegają stopniowej transformacji do apatytu. Pozwala to oczekiwać nie tylko ich wysokiej biozgodności, ale także właściwości osteokondukcyjnych i stymulacji regeneracji tkanki kostnej [1,2]. Wadą niektórych cementów opartych na fosforanach wapnia jest ich podatność na wymywanie w bezpośrednim kontakcie z krwią lub innymi płynami oraz ich kruchość. Zaletą jest możliwość łatwej aplikacji metodą iniekcji [3,4]. By podnieść wytrzymałość mechaniczną i zapobiec dezintegracji po wczesnym kontakcie z płynami ustrojowymi wprowadza się modyfikacje składu związkami przciwwymywalnymi, podnoszącymi spoistość i przyczepność. Role te może spełniać alginian sodu [4]. Wykazano, że dodatek alginianu sodu do konwencjonalnych cementów wapniowo-fosforanowych zwiększa wytrzymałość mechaniczną cementu, która wzrasta znacząco wraz ze wzrostem stężenia alginanu sodu do poziomu 0,8% wag. Wyższe stężenia alginianu obniżają wytrzymałość mechaniczną i powodują spowolnienie lub nawet brak wiązania przy jego obecności większej niż 1% wag. [5]. W badaniach dyfrakcyjnej analizy rentgenowskiej wykazano brak wpływu stężenia alginianu sodu, w zakresie 0-2,0% wag., na konwersję cementów fosforanowych w apatyt [2,5]. Stwierdzone zostało i praktycznie wykorzystane w inżynierii tkankowej pozytywne, ochronne oddziaływanie alginanu sodu na komórki osteoblastów narażonych na cytotoksyczne, niezwiązane składniki cementu fosoranowo-wapniowego [6].

W Instytucie Szkła i Ceramiki (ISiC) w Warszawie opracowano trzy rodzaje cementów fosforanowo-wapniowych w formie wstępnie płynnej, oznaczonych symbolami B, H, i K-0,25 alg. Przeprowadzone badania oddziaływania tych materiałów na fibroblasty mysie oraz komórki osteogenne wykazały brak działania cytotoksycznego. W teście XTT, będącego próbą oceny aktywności metabolicznej komórek, uzyskano podwyższone wartości w stosunku do próby kontrolnej. Cementy B i H wykazywały łatwość zarabiania, swobodny przepływ przez igłę iniekcyjną oraz brak oznak dezintegracji w środowisku wilgotnych tkanek. Natomiast cement K-0,25 alg, po kontakcie z krwią w ubytku kości wykazywał oznaki rozmywania się. Integralność struktury cementu K-0,25 alg uzyskano po modyfikacji jego składu wyjściowego przez zastosowanie dodatku alginianu do proszku w ilości 0,25% wag.

Celem badań była ocena reakcji żywej tkanki kostnej na wszczepy płynnej postaci cementu wapniowo-fosforanowego.

# Materiały i metody

Do badań implantacyjnych zastosowano cementy o następującym składzie:

• Cement oznaczony symbolem "H" – proszek o składzie:  $\alpha$ -TCP 98% wag.; HA 2% wag. i płyn wiążący w postaci roztworu wodnego Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3% wag.).

• Cement o symbolu "B" – proszek o składzie  $\beta$ -TCP 90,1% wag.; DCP 6,6% wag.; DCPD 3,3% wag. i płyn wiążący będący roztworem wodnym bursztynianu sodu (12% wag.). • Cement oznaczony symbolem "K-0,25 alg" - proszek o składzie  $\alpha$ -TCP 77,8% wag.,  $\beta$ -TCP 16,96% wag., DCPD 4,99% wag. i 0,25% wag. alginianu sodu i płyn wiążący będący roztworem wodnym bursztynianu sodu (12% wag.).

. . . . . . . . . . . . . .

Good integration of the implant with the bone can only be achieved if the filling material is in close contact with healthy tissue over a large area. A new material, liquid calcium phosphate cement potentially fulfils the above conditions. When injected to an irregular bone defect, it fills it tightly without the need to shape additionally the recipient site.

Cement based on calcium phosphate, after setting of the powder in liquid phase, undergoes gradual transformation to apatite. This allows expecting not only their high biocompatibility, but also osteoconductive properties and stimulation of bone tissue regeneration [1,2]. However some calcium phosphate cements in contact with blood and other fluids are susceptible to washout and are fragile [3,4]. In order to improve mechanical resistance and prevent disintegration after early contact with systemic fluids, their composition can be modified with anti-washout agents and agents improving cohesion and adherence. This role is performed by sodium alginate [4]. It was shown that the addition of sodium alginate to conventional calcium phosphate cements enhances the mechanical resistance of the cement, which increases significantly with increased concentration of sodium alginate to the level of 0.8 wt%. Higher concentrations of sodium alginate reduce the mechanical resistance and cause slowing down or even lack of setting when the level is higher that 1 wt% [5]. Diffraction radiological analysis showed lack of effect of sodium alginate concentration at 0-2.0 wt.% range on the conversion of phosphate cement into apatite [2,5]. Positive, protective effect of sodium alginate on osteoblasts exposed to cytotoxic, unbound components of calcium phosphate cement was confirmed and practically applied in tissue engineering [6].

Three forms of liquid calcium phosphate cements, designated B, H and K-0.25 alg were developed at the Institute of Glass and Ceramics (ISiC) in Warsaw. Studies of the effect of these materials on mice fibroblasts and osteogenic cells did not demonstrate any cytotoxic effect. The XTT test, which was performed to evaluate the metabolic activity of cells, revealed increased values in comparison to control sample. B and H cements were easily mixable and were characterized by free flow through the injection needle as well as lack of signs of disintegration in the environment of moist tissues. On the other hand, K-0.25 alg cement showed the signs of washout after contact with blood in the bone loss. The integrity of K-0.25 alg structure was obtained after modification of its initial composition with powder alginate at the amount of 0.25 wt%.

The aim of the study was to evaluate the reaction of living bone tissue to the injection of liquid form of calcium phosphate cement.

# Materials and methods

The cements used in implantation studies had the following composition:

• Cement designated ",H" – powder containing:  $\alpha$ -TCP 98 wt%; HA 2 wt% and setting fluid in the form of water solution of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3 wt%).

• Cement designated ",B" – powder containing  $\beta$ -TCP 90.1 wt%; DCP 6.6 wt%; DCPD 3.3 wt% and setting fluid in the form of sodium succinate solution (12 wt%).

• Cement designated "K-0.25 alg" – powder containing  $\alpha$ -TCP 77.8 wt%,  $\beta$ -TCP 16.96 wt%, DCPD 4.99 wt% as well as 0.25 wt% sodium alginate and setting fluid in the form of water solution of sodium succinate (12 wt%).

The powders were composed of the following calcium phosphates:

• α-TCP manufactured by ISiC as high-temperature polymorphic modification of tricalcium phosphate,

β-TCP, a low-temperature polymorphic modification of tricalcium phosphate purchased as a marketing product from Fluka,
DCP, calcium hydrogen phosphate, CaHPO<sub>4</sub>, purchased as a marketing product from POCh, Skład proszków stanowiły następujące fosforany wapnia:
 α-TCP wytworzony w ISiC jako wysokotemperaturowa odmiana polimorficzna fosforanu trójwapniowego,

 β-TCP będący niskotemperaturową odmianą polimorficzną fosforanu trójwapniowego, zakupiony jako produkt handlowy firmy Fluka,

• DCP będący wodorofosforanem (V) wapnia o wzorze chemicznym CaHPO<sub>4</sub>, zakupiony jako produkt handlowy POCh,

• DCPD (wodorofosforan (V) wapnia dihydrat) o wzorze chemicznym CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, zakupiony jako produkt handlowy POCh,

• HA będący ortofosforanem wapnia o wzorze chemicznym Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, zakupiony jako produkt handlowy Alfa Aesar. Związek ten został zastosowany w cemencie H jako nukleator krystalizacji.

Cement K-0,25 alg zawierał ponadto alginian sodu, zakupiony jako produkt handlowy Fluka.

Opracowane cementy zawierały proszek i płyn, które po wymieszaniu w proporcji 3g proszku na 1ml płynu tworzyły masę plastyczną, która w temperaturze pokojowej lub w temperaturze 37°C ulega związaniu przez rozpuszczanie jednych fosforanów i strącanie innych. Dominującą fazą krystaliczną w związanych cementach jest hydroksyapatyt. Proszki poddane były sterylizacji radiacyjnej. Płyny zostały zakonfekcjonowane po filtracji w komorze z laminarnym przepływem powietrza. Plastyczne cementy aplikowano za pomocą strzykawki w ilości 1ml.

Badania wykonano za zgodą I Regionalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach we Wrocławiu.

Badania przeprowadzono na 27 królikach rasy nowozelandzkiej przeznaczając po trzy króliki na każdy rodzaj materiału i planowany termin sekcyjny, po 1, 2 i 3 miesiącach. Materiał wszczepiano do krętarzy kości udowej. W obu krętarzach nawiercano po 2 kanały o średnicy 3 mm. Do tak wykonanych operacyjnych ubytków, za pomocą strzykawki lekarskiej wprowadzano po 1ml cementu w półpłynnej postaci. Mięśnie zszywano pojedynczymi szwami z nici wchłanianych Dexon 3-0 (Syneture, USA). Skórę zszywano pojedynczymi szwami stosując poliamidowe nici niewchłanialne, Amifil M 3-0 ( Sinpo, Poznań). Wykonywana była codziennie ocena ogólnego stanu zdrowia królików, ze szczególnym uwzględnieniem gojenia się ran operacyjnych, ruchomości czynnej i biernej stawu biodrowego oraz wykorzystania paszy.

W zaplanowanych terminach, tj. po 1, 2, i 3 miesiącach po wszczepieniu cementów, wykonano eutanazję królików. W czasie wykonywanych sekcji, w pierwszej kolejności oceniano makroskopowo ranę pooperacyjną oraz wygląd tkanek w miejscu wszczepienia próbek. Następnie pobierano kości udowe wraz z implantami do badań histologicznych i oceniano stan narządów wewnętrznych.

Do badań mikroskopowych fragment kości udowej wraz z wszczepami utrwalano w 10% wodnym roztworze formaldehydu w buforze fosforanowym. Następnie kość odwapniano. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą Van Gieson (VG). Preparaty histologiczne oceniano pod mikroskopem świetlnym Axioskop (firmy Zeiss), z zastosowaniem komputerowego programu do analizy i akwizycji obrazu (Axiovision firmy Zeiss).

# Wyniki

Do 48 godzin po wykonanym zabiegu wszystkie zwierzęta wykazywały zmniejszony apetyt, pobierając nie więcej niż 50% dziennej dawki pokarmowej przy zachowanym łaknieniu. W trzeciej dobie spożywanie paszy wracało do normy. Wszystkie zwierzęta przeżyły do czasu planowanych terminów sekcyjnych i nie wykazywały klinicznych objawów chorobowych. Zwierzęta zachowały czynną i bierną ruchomość w stawach biodrowych. • DCPD, calcium hydrogen phosphate dihydrate, CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, purchased as a marketing produkt from POCh,

• HA, calcium orthophosphate,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , purchased as a marketing product from Alfa Aesar. This compound was used in the H cement as a crystallization nucleator.

Moreover, K-0.25 alg cement also contained sodium alginate purchased as a marketing product from Fluka.

The cements contained powder and fluid in proportion of 3g of powder per 1ml of fluid, which, after mixing, produced a plastic mass, which at room temperature or at 37°C undergoes setting by dissolution of some phosphates and precipitation of others. Hydroxyapatite is the dominating crystalline phase in the bounded cements. The powders were submitted to radiation sterilization. The liquids were prepared for use after filtration in a chamber with laminar air flow. Plastic cements were applied by means of a syringe in 1ml portions.

The study protocol was approved by the Regional Ethical Committee for Animal Studies in Wrocaw.

The investigations involved 27 New Zealand rabbits, three animals for each kind of the material and the autopsy was planned after 1, 2 and 3 months. The material was implanted into the femoral bone trochanters. Two 3 mm channels were drilled in both trochanters and 1 ml of semi-liquid cement was injected by means of a medical syringe to such performed bone loss. The muscles were closed with single absorbable Dexon 3-0 sutures (Syneture, USA). The skin was sutured with single polyamide non-absorbable Amifil M 3-0 sutures (Sinpo, Poznań). Evaluation of the general condition of the animals, with special regard to wound healing, active and passive mobility of the hip joint and the use of fodder was performed daily.

In the planned time, i.e. 1, 2 and 3 months after injection of cement the rabbits were sacrificed. On autopsy the wound and tissues at the site of injection were evaluated macroscopically. Next femoral bone samples with implants were collected for histopathological examination and the condition of internal organs was evaluated.

For microscopic studies, femoral bone fragments including the implants were fixed in 10% formaldehyde solution in phosphate buffer. Next the bone was decalcified. The samples were stained with hematoxylin and eosin (HE) and with Van Gieson method (VG). The histological preparations were evaluated in Axioskop light microscpe (manufactured by Zeiss), using software for picture analysis and acquisition (Axiovision manufactured by Zeiss).

## Results

Up to 48 hours after the procedure all the animals revealed decreased appetite and were using not more than 50% of their daily fodder, with normal thirst. On the third day after the procedure the use of fodder returned to normal. All the animals survived until the planned time of autopsy and did not show any clinical signs of illness. The animals preserved active and passive mobility in the hip joints.

All the autopsied animals exhibited skin wounds healing by first intention. The macroscopic picture after implantation of all the injected cements was similar. Soft tissues and bone adjoining the implant site were normal in colour and architecture. One month after injection of the liquid cement they were partly covered with periosteum. Two months after the procedure the site of injection was invisible and the bone defect was completely covered with periosteum. The cements fused firmly with the surrounding bone. Transverse sections of the femoral bones in the third month revealed irregular fragments of implants filling spaces in the spongy bone. No pathological lesions in the internal organs were found on autopsy examinations. U wszystkich sekcjonowanych zwierząt rany skórne zagoiły się przez rychłozrost. Obraz makroskopowy po implantacji wszystkich badanych cementów był podobny. Tkanki miękkie oraz kość w bezpośrednim sąsiedztwie wszczepów miały barwę i rysunek prawidłowy. W 1 miesiącu po wszczepieniu próbki płynnego cementu były częściowo pokryte okostną. W 2 miesiącu obserwacji miejsce wszczepu było niewidoczne, ubytek kości został całkowicie pokryty przez okostną. Cementy były mocno zespolone z otaczającą je kością. W poprzecznych przekrojach kości udowych do 3 miesiąca obserwacji, widoczne były nieregularnego kształtu fragmenty wszczepów wypełniające przestrzenie kości gąbczastej. W czasie wykonywania sekcji nie stwierdzono zmian o charakterze patologicznym w narządach wewnętrznych.

### Badania mikroskopowe

### cement B

W 1 miesiącu obserwacji widoczna była gąbczasta tkanka kostna, w której przestrzenie pomiędzy beleczkami wypełnione były wszczepem cementowym o nieregularnej formie. W bezpośrednim sąsiedztwie tworzyw obecne było waskie pasmo tkanki łącznej, oddzielające je od tkanki kostnej, lub widoczne były fragmenty wszczepu ograniczone i przerośnięte pasmami tkanki kostnej z obecnymi licznymi i aktywnymi osteoblastami. W szpiku kostnym obserwowano pozostałości wysięku z licznymi naczyniami krwionośnymi i homogennie barwiącymi się masami. W 2 miesiącu po implantacji widoczne były przestrzenie wypełnione cementem ograniczone miejscami młodą splotowatą tkanką kostną, a miejscami chrzęstną lub włóknistą tkanką łączną. W obrębie pofragmentwanego implantu obecne były liczne pasma tkanki kostnej. W 3 miesiącu obserwacji liczne, małe fragmenty wszczepu, znajdujące się w kości gąbczastej, otoczone były i poprzerastane tkanką kostną. Od strony szpiku kostnego fragmenty materiału były oddzielone pasmem tkanki kostnej z wyspami tkanki łącznej.

#### cement H

W 1 miesiącu po operacji w preparatach histologicznych widoczna była kość gabczasta, w której przestrzenie pomiędzy beleczkami kostnymi wypełniała amorficzna struktura cementu. Na granicy faz ze szpikiem kostnym cement ograniczało pasmo tkanki łącznej z licznymi cienkościennymi naczyniami i skupiskami komórek zapalnych. W 2 miesiącu po operacji widoczne były fragmenty wszczepu otoczone tkanką kostną, z licznymi osteoblastami na powierzchni beleczek kostnych. W bezpośrednim sąsiedztwie tkanki kostnej, na granicy z wszczepem, znajdowano pozostałości wysięku, nagromadzenia komórek zapalnych i liczne cienkościenne naczynia krwionośne. W 3 miesiącu po wszczepieniu widoczne były fragmenty cementu, otoczone tkanką kostną, niekiedy tkanką chrzęstną lub wyspami tkanki łącznej. Od strony szpiku kostnego wszczepy oddzielało cienkie pasmo tkanki kostnej. W otaczającej implanty tkance kostnej zaznaczona była silna aktywność osteoblastów układających się wzdłuż blaszek kostnych.

## cement K-0,25 alg

W 1 miesiąc obserwacji widoczne były wszczepy o nieregularnym kształcie, ograniczone tkanką kostną, pośród której miejscami widoczny był rozplem tkanki łącznej. Beleczkowa tkanka kostna otaczająca implant miejscami oddzielona była od wszczepu pasmem szpiku kostnego z widocznymi pozostałościami wysięku i licznymi cienkościennymi naczyniami krwionośnymi. Wokół wszczepu w tkance kostnej znajdowały się fragmenty materiału. 2 miesiące po implantacji widoczny był pomniejszony i pofragmentowany wszczep, otoczony tkanką kostną i łączną. Fragmenty materiału znajdowano w znacznym oddaleniu od centrum wszczepu. Były one otoczone i zamknięte blaszkowatą tkanką kostną. 3 miesiące po operacji w preparatach histologicznych widoczne były implanty pofragmentowane i przerośnięte blaszkowatą tkanką kostną.

#### **Microscopic examinations**

#### cement B

In the first month of observation, spaces between trabeculae in the spongy bone were filled with cement implant of irregular form. Immediately adjoining the cement there were narrow layers of connective tissue separating it from the bone tissue, or there were visible fragments of the implant which were limited and overgrown with bone tissue fibres with numerous and active osteoblasts. The bone marrow revealed the remains of exudates with numerous blood vessels and homogenously staining mass. Examination performed two months after the implant revealed spaces filled with cement, locally limited with young, plexiform bone tissue and cartilaginous or fibrous connective tissue in places. The fragmented implant revealed the presence of numerous bands of bone tissue. In the third month of observation, numerous, small fragments of the implant situated in the spongy bone were surrounded and overgrown with bone tissue. Fragments of the material were separated from bone marrow by bone tissue with islands of connective tissue.

#### cement H

Examination one month after the surgery showed spongy bone with spaces between trabeculae filled with amorphic cement structures. On the border of the phases and bone marrow the cement was surrounded by a layer of connective tissue with numerous thin-walled blood vessels and congregations of inflammatory cells. Two months after the operation fragments of the implant were surrounded by bone tissue with numerous osteoblasts on the surface of bone trabeculae. Immediately surrounding the bone tissue, on the border with the implant, there were observed remains of exudates, congregations of inflammatory cells and numerous thin-walled blood vessels. Three months after, the implant observation revealed fragments of cement surrounded with bone tissue, sometimes with cartilaginous tissue or connective tissue islands. The implants were separated from bone marrow by a thin layer of bone tissue. The bone tissue surrounding the implants revealed a potent osteoblasts activity, which were situated along the bone lamellae.

## cement K-0.25 alg

Examination one month after the surgery showed irregular implants surrounded by bone tissue, with visible proliferations of connective tissue in places. Trabecular bone tissue surrounding the implant was locally separated from the implant by a layer of bone marrow with remains of exudates and numerous thinwalled blood vessels. Fragments of the material were visible in bone tissue around the implant. Examination two months after the operation revealed the presence of decreased and fragmented implant surrounded by bone tissue and connective tissue. Fragments of the material were found in distant locations from the centre of the implant. They were surrounded and closed with laminar bone tissue. Three months after the operation the histopathological preparations demonstrated fragmented implants which were overgrown with laminar bone tissue.

## Resume

The examinations involved evaluation of local reaction of bone tissue 1, 2 and 3 months after implantation of three kinds of calcium phosphate cement designated B, H and K-alg to rabbit femoral bones. Each of the three materials was prepared in the form of semi-product containing powder and liquid components which were mixed immediately prior to application. Comparative macroscopic and microscopic studies after implantation of the three kinds of calcium phosphate cement revealed a similar sample healing pattern. Bone defects reconstructed by means of the investigated cements were completely covered with periosteum within one month since implantation. Transverse sections of the femoral bones at the 27



RYS.1. Obraz mikroskopowy cementów fosforanowo-wapniowych aplikowanych iniekcyjnie do tkanki kostnej w 3 miesiącu obserwacji.

FIG.1. Microscopic view of calcium phosphate implants injected to bone tissue in 3<sup>rd</sup> month of observation. A) cement K-alg (H&E, 280x), B) cement B (H&E, 140x), C) cement H (V&G, 140x).

## Podsumowanie

Badania obejmowały ocenę miejscowej reakcji tkanki kostnej 1, 2 i 3 miesiące po wszczepieniu do kości udowych królików trzech rodzajów cementów wapniowofosforanowych, oznaczonych symbolami B, H i K-alg. Każde z trzech tworzyw przygotowano w postaci półproduktów zawierających składnik proszkowy i płynny do zarobienia bezpośrednio przed wszczepieniem. Na podstawie przeprowadzonych badań porównawczych, makroskopowych i mikroskopowych, po wszczepieniu trzech rodzajów cementów fosforanowo-wapniowych, stwierdzono podobny obraz wgajania się próbek. W okresie do 1 miesiąca po wszczepieniu ubytki w kościach, do których wprowadzono próbki badanych cementów, zostały całkowicie pokryte okostną. W przekrojach poprzecznych kości udowych, w miejscu wszczepów, w 3 miesiacu obserwacji widoczne były nieregularnego kształtu fragmenty wszczepów znajdujące się w kości gąbczastej. W badaniach mikroskopowych, w pierwszym miesiącu po wszczepieniu, stwierdzano wyraźną fazę wysiękową, która ustępowała w drugim miesiącu. W tym okresie obserwowano obecność tworzącej się nowej tkanki kostnej, otaczajacej i wnikajacej w strukture implantu. Stwierdzono też wysoką aktywność osteoblastów, prowadzącą do powstawania beleczek blaszkowatej tkanki kostnej, która w 3 miesiącu obserwacji otaczała i przerastała ulegające biodegradacji i defragmentacji cementy. Cementy ulegały przerastaniu tkanką kostną nie tylko w strefie brzeżnej, ale także wewnątrz wszczepu. W 3 miesiącu obserwacji cementy uległy znaczącej resorpcji (w ok. 50%) w porównaniu ilości wyjściowych. Rozwinięcie powierzchni oddziaływania miało wpływ na wysoki stopień resorpcji, co wynikało z płynnej formy cementów. Zapewniało to rozległy kontakt z krwią i innymi płynami ustrojowymi, podnosiło stopniową rozpuszczalność oraz podwyższało aktywność komórkową [7]. Na podstawie przeprowadzonych badań mikroskopowych stwierdzono, że płynne postaci cementu fosforanowo-wapniowego są łatwe do implantacji, szczelnie wypełniają ubytek kości, co zapewnia dobry kontakt wszczepu z tkanką.

# Wnioski

1. Fosforanowo-wapniowe cementy w formie płynnej są łatwo do aplikacji i szczelnie wypełniają ubytek kości.

2. Cementy fosforanowo-wapniowe we wstępnej postaci płynnej charakteryzują się wysokim stopniem biozgodności i ulegają biodegradacji około 50% objętości, w ciągu 3 miesięcy.

3. Proces osteokondukcji najszybciej przebiegał w stosunku do cementu zawierającego alginian sodu. site of implantation three months after the procedure revealed the presence of irregular fragments of the implants in the spongy bone. Microscopic examinations one month after implantation revealed a distinct exudates phase, which disappeared in the second month. In this time the presence of newly formed bone tissue surrounding and overgrowing the structure of the implant was observed. Moreover, high osteoblastic activity leading to formation of trabeculae of laminar bone tissue was observed, which surrounded and overgrew undergoing biodegradation and defragmentation cements in the 3rd observation month. The cements were overgrown with bone tissue not only in the marginal zone, but also inside the implant. Observations in the third month revealed a significant resorption (in about 50%) of the cements in comparison to the initial amounts. The high rate of resorption was possible due to extension of the activity surface associated with the use of a liquid form of the cements. This enabled extensive contact of the implant with blood and other systemic fluids and enhanced cell activity [7]. Microscopic examinations confirmed that liquid forms of calcium phosphate cements are easily implantable and fill tightly the bone loss what provides good contact of the implant with tissue.

## Conclusions

1. Calcium phosphate cements in the liquid form are easily applicable and fill tightly the bone loss.

2. Calcium phosphate cements in the initial liquid form are characterized by high biocompatibility and undergo 50% biodegradation in three months.

3. The process of osteoconductivity was the quickest in the case of cement containing sodium alginate.

## Piśmiennictwo

## References

 Weir MD, Xu HH, Simon CG. Strong calcium phosphate cement-chitosan-mesh construct containing cell-encapsulating hydrogel beads for bone tissue engineering. J Biomed Mater Res A. 2006 Jun 1;77(3):487-96.
 Tanaka S, Kishi T, Shimogoryo R, Matsuya S, Ishikawa K. Biopex acquires anti-washout properties by adding sodium alginate into its liquid phase. Dent Mater J. 2003 Sep;22(3):301-12.

[3] Wang X, Chen L, Xiang H, Ye J. Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007 May;81(2):410-8.
[4] Khairoun I, Driessens FC, Boltong MG, Planell JA, Wenz R. Addition of cohesion promotors to calcium phosphate cements. Biomaterials. 1999 Feb;20(4):393-8.

[5] Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M, Nagayama M, Asaoka K. Nondecay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. Biomaterials. 1995 May;16(7):527-32.

[6] Simon CG, Guthrie WF, Wang FW. Cell seeding into calcium phosphate cement. J Biomed Mater Res A. 2004 Mar 15;68(4):628-39.
[7] del Valle S, Miño N, Muñoz F, González A, Planell JA, Ginebra MP. In vivo evaluation of an injectable Macroporous Calcium Phosphate Cement. J Mater Sci Mater Med. 2007 Feb;18(2):353-61.

28



29

•