

PILOTAŻOWE BADANIA KLINICZNE NAD EFEKTYWNOŚCIĄ ELASTYCZNEGO KOMPOZYTU OPARTEGO NA HAp DLA WYPEŁNIANIA UBYTKÓW KOSTNYCH

BELCARZ A.¹, GINALSKA G.¹, POLKOWSKA I.², PRZEKORA A.¹, ŚLÓSARCZYK A.³, ZIMA A.³, PASZKIEWICZ Z.³

¹UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII, UL. CHODZKI 1, 20-093 LUBLIN, POLSKA

²UNIWERSYTET PRZYRODNICZY, WYDZIAŁ MEDYCZYNY WETERYNARYJNEJ, UL. GŁĘBOKA 30, 290812 LUBLIN, POLSKA

³AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KATEDRA TECHNOLOGII I CERAMIKI, AL. MICKIEWICZA 30/B6, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 16-18]

Wstęp

Hydroksyapatyt (HAp) jest dobrze znanym wypełniaczem ubytków kostnych, cenionym – zwłaszcza w formie porowatej – za biokompatybilność, bioaktywność, osteokonduktywność, brak własności alergizujących, niekancerogenność i podatność na sterylizację [1-3]. Wadami jego jest słaba resorpcja, kruchość oraz niewielka odporność na złamanie [4]. Ponadto czysto praktycznym negatywnym aspektem pracy z hydroksyapatytem jest jego mała poręczność chirurgiczna, na którą skarżą się chirurdzy. W celu polepszenia własności mechanicznych oraz poręczności chirurgicznej tego wypełniacza można wprowadzać do niego dodatek substancji spajających i zwiększających elastyczność np. żelu fibrynowego [5], kolagenowego czy opatentowanych BioLinkerów.

Ostatnie badania wykazały, że czynnikiem uplastyczniającym może być dodatek glukanu, substancji wykazującej pozytywne efekty w leczeniu przeciwwirusowym i przeciwbakteryjnym. Kompozyt, zawierający glukon i HAp w postaci wysokoporowatych granul, charakteryzuje się dobrymi parametrami mechanicznymi, zbliżonymi do parametrów kości gąbczastej i bioaktywnością w SBF. W prezentowanej pracy przetestowano próbki kompozytu z zastosowaniem linii komórkowej prawidłowych ludzkich osteoblastów oraz po wszczepieniu w obręb przetok ustno-nosowych u psów. Celem przeprowadzanych doświadczeń było pilotażowe określenie cytotoksyczności kompozytu oraz jego wpływu na gojenie się przetok ustno-nosowych in vivo.

Materiały i metody

Kompozyt HAp-glukan został przygotowany zgodnie z protokołem opisanym w patencie P-387872.6

Cytotoksyczność granul HAp i materiału kompozytowego oszacowano metodą pośrednią przez zastosowanie odpowiednich ekstraktów. Test NRU (Neutral Red Uptake) wykonano z zastosowaniem linii prawidłowych płodowych ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, pochodzącej z banku komórek ATCC (American Type Culture Collection, Menassas, VA). Hodowlę prowadzono w temperaturze 34°C i atmosferze 5% CO₂. Zawieszinę komórek hFOB o gęstości 3 • 10⁵ komórek/ml podłoża rozlano w ilości po 100 µl/dołek

PILOT CLINICAL STUDY OF EFFICACY OF FLEXIBLE HAp-BASED COMPOSITE FOR BONE DEFECTS REPLACEMENT

BELCARZ A.¹, GINALSKA G.¹, POLKOWSKA I.², PRZEKORA A.¹, ŚLÓSARCZYK A.³, ZIMA A.³, PASZKIEWICZ Z.³

¹MEDICAL UNIVERSITY OF LUBLIN, CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, 1 CHODZKI STR., 20-093 LUBLIN, POLAND

²UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, 30 GŁĘBOKA STR., 20-612 LUBLIN, POLAND

³AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CHAIR OF TECHNOLOGY AND CERAMICS, 30/B6 MICKIEWICZ AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 16-18]

Introduction

Hydroxyapatite (HAp) is a well-known filler for bone defects, appreciated – especially in porous form – for its biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity, lack of allergic reactions occurrence and carcinogenous properties and susceptibility to sterilization [1-3]. Its disadvantages are poor resorption and low fracture toughness [4]. Moreover, the practical aspect of HAp handling is its poor surgical handiness which is the subject of surgeons complains. To improve mechanical properties and surgical handiness of this filler, some glues and elasticity-increasing factors may be added such as fibrin glue [5], collagen gel or patented BioLinkers.

Recent studies revealed that glucan, which also shows antiviral and antibacterial properties, might be considered as such a plasticizing agent. The composite, containing glucan and HAp in a form of highly porous granules, shows good mechanical parameters (resembling those of human spongy bone) and bioactivity in SBF. In presented work, composite samples were tested using human osteoblasts cell line and also after implantation to oronasal fistulae in dogs. The aim of performed experiments was pilot testing of composite cytotoxicity and its effect on oronasal fistulae healing in vivo.

Materials and methods

Composite HAp-glucan was prepared according to procedure described in Polish Patent P-387872.6

The HAp and the composite cytotoxicity levels were evaluated indirectly by means of fluid extracts. The NRU (Neutral Red Uptake) assay was carried out using hFOB 1.19 cell line (human fetal osteoblasts) obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Menassas, VA). Cells were cultured at 34°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 95% air. HFOB cells were seeded in 96-multiwell plates in 100 µl complete culture medium at a concentration of 3 • 10⁵ cells/well and cultured for 24 hours at 34°C to near confluence. Then the growth medium was replaced with the pure HAp or composite extracts. After 24 h of incubation at 34°C, the NRU colorimetric assay was performed to evaluate cell viability.

Extracts were obtained by immersing the test materials in a complete culture medium supplemented with 2% FBS under standard conditions: 72h, at 37°C without agitation.

do 96-wielodółkowych płytek i prowadzono inkubację przez 24 godziny w 34°C. Następnie podłoże wzrostowe znad hodowli zastąpiono 100% ekstraktami pozyskanymi z granul HAp i materiału kompozytowego. Po 24 godzinnej inkubacji z ekstraktami, wykonano test NRU w celu oszacowania żywotności komórek.

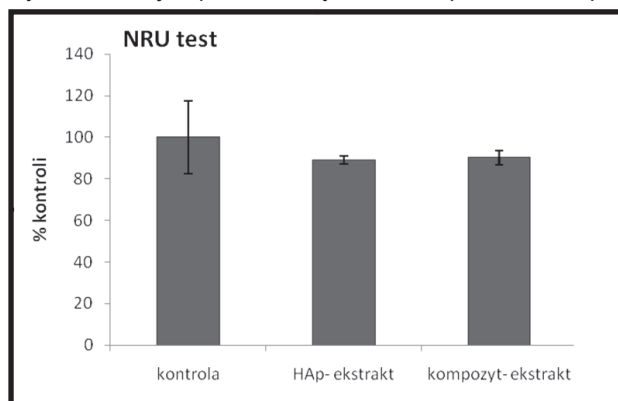
Ekstrakty z testowanych materiałów przygotowano w standardowych warunkach. Biomateriał kompozytowy i granule HAp umieszczono w pełnym podłożu hodowlanym z dodatkiem 2% FBS w stosunku 0,1 g materiału/ml podłoża i inkubowano bez wyrządzania w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Kontrolę ujemną stanowiło podłoże hodowlane inkubowane w analogicznych warunkach, ale bez materiału testowego. Do testów wykorzystano 100% eluaty.

Wszczepienia próbek kompozytu (wysterylizowanych tlenkiem etylenu) do przetoki ustno-nosowej dokonano u 5 psów (pacjenci Kliniki Chirurgii Małych Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie). Po nacięciu i odpreparowaniu płata śluzówkowo-okostnowego przeprowadzono skaryfikację zębodołu, przepłukano 5% roztworem gentamycyny, następnie zaimplantowano stożek kompozytu (nasączony sterylną wodą destylowaną i odpowiednio dopasowany do rozmiarów ubytku). Zębodoł od strony jamy ustnej zamknięto wcześniej odpreparowanym płatem śluzówkowo-okostnowym przy pomocy szwów.⁷ Ranę przemywano codziennie 0,15% roztworem chlorheksydyny oraz miejscowo stosowano maść Metronidazol.

Wyniki i dyskusja

Zastosowany test NRU jednoznacznie wskazuje na brak toksyczności zarówno samych granul HAp, jak i materiału kompozytowego wobec komórek linii hFOB (RYS.1). Dodanie glukanu do granul HAp nie spowodował istotnego obniżenia żywotności tych komórek w porównaniu z samymi granulami ceramicznymi.

Wprowadzenie kompozytu do przetoki ustno-nosowej u psów spowodowało bardzo szybkie (już po upływie 7-9 dni) zagojenie rany pooperacyjnej, bez śladów infekcji lub objawów zapalnych przez okres 4 miesięcy po operacji wszczepienia. Zdjęcia RTG miejsca poimplantacyjnego wykazało, że już po 1 miesiącu ciemne przestrzenie po-



RYS.1. Ocena cytotoksyczności ekstraktów pozyskanych z granul HAp i materiału kompozytowego wobec komórek linii hFOB po 24 godzinnej inkubacji. Wyniki zostały przedstawione jako % kontroli negatywnej i wyrażone jako wartości średnie \pm SD. **FIG.1.** Cytotoxicity evaluation of the HAp and composite extracts using hFOB cells after 24 hours of incubation by means of NRU assay. The results were expressed as the percentage of OD values obtained from the negative control and reported as the mean \pm SD.

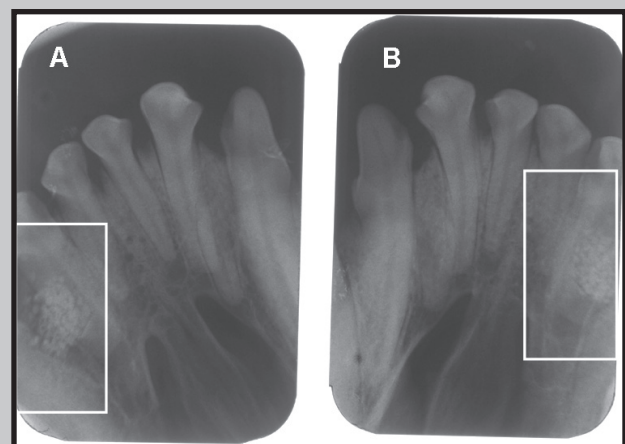
The ratio between the sample weight and the volume of the extraction vehicle was 0,1 g/ml beyond the absorptive capacity of the material. The extraction vehicle with no test material served as negative control. In the investigation, the pure extracts were used.

Implantation of composite samples (sterilized with ethylene oxide) into oronasal fistulae was performed for 5 dogs (patients of Clinic of Small Animals Surgery at University of Life Sciences in Lublin). After incision and preparation of mucoperiosteal flat, scarification of dental alveolus and washing with 5% gentamicin, the implantation of composite cone (soaked with sterile distilled water and properly fitted into dimensions of defect) was performed. Dental alveolus was closed using earlier prepared mucoperiosteal flat with sutures.⁷ The wound was washed daily with 0,15% chlorhexidine and locally treated with Metronidazole.

Results and discussion

The NRU test used in the experiments clearly shows lack of toxicity effect of both HAp granules and composite biomaterial on hFOB cells (FIG.1). Adding glucan to HAp granules did not affect cell viability.

Implantation of composite into dog's oronasal fistulae in case caused immediate (just after 7-9 days) healing of post-operative wound without signs of infection or inflammation for 4 months after the implantation procedure. RTG pictures of post-implantation site showed that after 1 month dark spaces between HAp granules became brighter, which indicates the beginning of mineralisation of these spaces and beginning of composite remodelling (FIG.2).



RYS.2. Zdjęcia RTG przetoki ustno-nosowej u psa wypełnionej próbką kompozytu HAp-glukan. A- Miejsce implantacji bezpośrednio po zabiegu (A) i 1 miesiąc od zabiegu wszczepienia (B).

FIG.2. RTG pictures of oronasal fistulae (in dog), filled with sample of HAp-glucan composite. Implantation site directly after the procedure (A) and after 1 month (B).

Conclusions

Obtained results suggest the composite prepared for bone defects repair does not show toxicity effect on osteoblasts. After implantation into oronasal fistulae in dogs, good results of post-operative wound healing, as well as the beginning of composite remodelling process were shown. The results of presented studies suggest that prepared HAp-glucan composite possesses good properties as a bone defects filler.

między białymi granulami HAP zaczęły się przejaśniać, co sygnalizuje początek mineralizacji tych miejsc i początek przebudowy kompozytu (RYS.2).

Wnioski

Uzyskane wyniki sugerują, że testowany kompozyt kościostępczy HAp-glukan nie wykazuje toksyczności wobec komórek osteoblastycznych. Po implantacji do przetok ustno-nosowych u psów wykazano dobre gojenie się rany pooperacyjnej oraz początek przebudowy wszczepionego materiału. Wyniki prezentowanych badań biologicznych świadczą o dobrych właściwościach wytworzonego kompozytu HAp-glukan do wypełnień ubytków kostnych.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków własnych UM w Lublinie na naukę DS2/09, PW1/09 oraz projektu badawczego UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-01.

ZMIANY POWIERZCHNI IMPLANTU METALOWEGO POKYTEGO POWŁOKĄ POLIMEROWĄ POD WPŁYWEM KONTAKTU Z PŁYNEM FIZJOLOGICZNYM

M.CIEŚLIK^{1,2*}, K.ENGVALL³, J.PAN⁴, A.KOTARBA¹

¹WYDZIAŁ CHEMII, UNIwersytet Jagielloński,
INGARDENA 3, 30-060 KRAKÓW, POLSKA

²INSTYTUT METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, PAN,
W.REYMONTA 25, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

³SWEREA KIMAB AB., P. O. BOX 55970,
SE-10216 SZTOKHOLM, SZWECJA

⁴INSTYTUT NAUKI O POWIERZCHNI I KOROZJI, WYDZIAŁ CHEMII,
KRÓLEWSKA SZKOŁA WYŻSZA, DROTTNING KRISTINAS VÄG. 51,
SE-100 44 SZTOKHOLM, SZWECJA
MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 99-101, (2010), 18-21]

Wstęp

Ze względu na swoje własności mechaniczne, zdolność do nadawania kształtów oraz niską cenę w porównaniu z innymi metalicznymi materiałami implantacyjnymi (stopy tytanu i kobaltu) stal nierdzewna jest często używanym materiałem implantacyjnym. Jednak, podczas długotrwałego kontaktu z tkankami ludzkimi następują procesy korozyjne na powierzchni stali związane z niepożądanym uwalnianiem jonów metali takich jak: żelazo, chrom i nikiel [1]. Korozja i proces uwalniania jonów powodują nie tylko uszkodzenia mechaniczne implantów, ale również odczuwania bólu w pobliżu wszczepionego implantu. Dlatego też implanty wymagają specyficznego rodzaju obróbki powierzchniowej w celu zminimalizowania szkodliwych zjawisk [2]. Obecnie, powłoki polimerowe wykorzystywane są do modyfikacji

Acknowledgements

This work was supported by financial support from Medical University of Lublin (DS2/09, PW1/09) and UDA-POIG.01.03.01-00-005/09-01 project.

Piśmiennictwo

References

- [1] Jarcho M., Kay J.F., Kumar K.I., Doremus R.H., Drobeck H.P. J. Biosci. Bioeng. 1 (1977) 79-91.
- [2] Kokubo T., Kim H.-M., Kawashita M. Biomaterials 24 (2003) 2161-2175.
- [3] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A. Sci. Tech. Adv. Mater. 8 (2007) 116-123.
- [4] Porter A.E., Botelho C.M., Lopes M.A., Santos J.D., Best S.M., Bonfield W. J. Biomed. Mater. Res. A 69 (2004) 670-679
- [5] Le Nihouannen D., Le Guehennec L., Rouillon P., Bilban M., Layrolle P., Daculsi G. Biomaterials 27 (2006) 2716-2722.
- [6] Belcarz A., Ginalska G., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z. Bioactive composite and process for the production of the same. 2009; Polish Patent PL-387872
- [7] Smith M.M. Clin. Tech. Anim. Pract. 15 (2000) 243-250

CHANGES IN POLYMER COATED METAL IMPLANT SURFACE UPON CONTACT WITH BODY FLUID

M.CIEŚLIK^{1,2*}, K.ENGVALL³, J.PAN⁴, A.KOTARBA¹

¹FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
3 INGARDENA STR., 30-060 KRAKOW, POLAND,

²INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE, PAS,
25 W.REYMONTA STR., 30-059 KRAKOW, POLAND

³SWEREA KIMAB AB. P. O., BOX 55970, SE-10216 STOC-
KHOLM, SWEDEN.

⁴DIV. OF SURFACE & CORROSION SCIENCE, DEPT. OF CHEMISTRY,
ROYAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, DROTTNING KRISTINAS VÄG.
51, SE-100 44 STOCKHOLM, SWEDEN
MAILTO: CIESLIK@CHEMIA.UJ.EDU.PL

[Engineering of Biomaterials, 99-101, (2010), 18-21]

Introduction

Stainless steel (SS) due to its mechanical strength, the capability to bend and shape and relatively low cost in comparison with titanium or cobalt alloys is one of the most common used orthopaedic implant material. However, upon prolonged contact with human tissue (corrosion phenomena take place on SS surface resulting in undesirable release of hazardous for health transition metal ions [1]. The corrosion process, accompanied by release of ions, leads not only to mechanical failure of implant but also to local pain and swelling in the near implant region. Therefore, the metal based implants need specific surface finishing in order to minimizing the adverse effects [2]. Nowadays, in many industrial areas polymer coatings for surface modification are widely applied and it was already suggested that this