

Ceramiczne materiały korundowe o modyfikowanej powierzchni jako materiały implantacyjne

Robert Lewandowski¹, Roman Rutowski², Danuta Paluch¹, Jolanta Staniszevska-Kuś¹, Beata Zboromirska-Wnukiewicz³, Adam Sokołowski³, Bogusława Żywicka¹, Jan Wnukiewicz⁴

¹ Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Klinika Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki Akademii Medycznej we Wrocławiu

³ Instytut Elektrotechniki we Wrocławiu

⁴ Katedra i Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Badania nad implantami dowiodły, że nie tylko rodzaj struktury materiału, ale również charakter powierzchni wszczepów wpływa na odczyn miejscowy biomateriałów. W ostatnich latach zainteresowanie wzbudzają reakcje elektrochemiczne na powierzchni implantów, prowadzące do powstania tzw. potencjału zeta. Wykorzystanie tych właściwości skłoniło nas do przeprowadzenia badań eksperymentalnych z zastosowaniem biomateriałów o aktywnej powierzchni oraz wpływu potencjału zeta na ich biogodność.

Celem pracy jest ocena wpływu ładunku elektrycznego o charakterze potencjału zeta, na reakcję miejscową tkanki kostnej po implantacji. Do badań wykorzystano 2 rodzaje ceramiki: litą i litą silanowaną o aktywnej powierzchni. Badania implantacyjne wykonano na 20 królikach. Sekcje przeprowadzono 12, 26, 36 i 54 tygodnie po wszczepieniu badanych materiałów.

Po implantacji ceramiki litej, stwierdzono wokół wszczepu oprócz tkanki kostnej tkankę łączną włóknistą. Natomiast w przypadku ceramiki litej silanowanej, we wszystkich

terminach badań, wokół wszczepu widoczna była tkanka kostna ściśle przylegająca do implantu.

Badania potencjału elektrokinetycznego zeta, przeprowadzone 36 i 54 tygodnie po implantacji wykazały, że wartości tego potencjału pierwotnie wprowadzone na powierzchnię wszczepów, utrzymywały się na stabilnym poziomie. Przeprowadzone badania potwierdziły, że aktywacja powierzchni implantów poprzez silanowanie metodą zol-żel, pozwala na wprowadzanie zaplanowanego potencjału zeta w zależności od potencjału charakterystycznego dla danego rodzaju tkanki.

Słowa kluczowe: ceramika lita, ceramika lita silanowana, potencjał zeta, reakcja tkanki kostnej

WSTĘP

Najbardziej reprezentatywną dziedzinę zastosowania biomateriałów pod względem ilościowym i jakościowym, stanowi chirurgia rekonstrukcyjna układu kostnego. Złożone uwarunkowania bioniki ruchu oraz środowiska tkanki kostnej, wymagają stosowania materiałów o specyficznych właściwościach fizykochemicznych i funkcjonalnych.

W celu zapewnienia odpowiedniej zgodności implantu ze środowiskiem piezoelektryków i półprzewodników organicznych, dla uzyskania odpowiedniego połączenia implant-kość, należy zapewnić odpowiedni stan fizykochemiczny powierzchni materiału implantowanego do organizmu [1].

Podczas wytwarzania bioceramicznych kompozytów, często występuje potrzeba wprowadzania specyficznych spoiw i stosowania nietypowych metod technologicznych, które pozwalają na ich dokładne formowanie, a w końcowym efekcie uzyskanie kompozytu o optymalnie zaprogramowanych właściwościach [2-4].

Wytwarzanie materiału zastępczego, o takich parametrach jak kość, jest bardzo trudne. W większości publikacji kość traktowana jest jako materiał konstrukcyjny, zróżnicowany anatomicznie co do wielkości i kształtu. W zależności od funkcji implantu w organizmie główny nacisk kładzie się na jego budowę teksturalną, tj. wielkość i kształt porów [5-7]. Biomateriały stosowane w chirurgii rekonstrukcyjnej charakteryzują się podobnymi właściwościami mikrostrukturalnymi, sposobem wykończenia powierzchni i właściwościami chemicznymi.

Wyniki badań implantów doprowadziły badaczy do wniosków, że nie tylko rodzaj struktury materiału, ale również charakter powierzchni wszczepów wpływa na odczyn miejscowy wokół biomateriału. Badania nad biomateriałami i ich powierzchnią prowadzono nie tylko porównując je z innymi implantami, ale również w zależności od stosowania różnych technologii ich otrzymywania.

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy wzbudzą reakcje elektrochemiczne na powierzchni implantów, prowadzące do powstawania zjawisk elektrycznych na granicach fazowych i występowania tzw. potencjału zeta. Badanie tych zjawisk oraz możliwość pomiaru potencjału zeta skłania do podjęcia badań nad implantami o powierzchniach aktywnych [2, 5, 8]. Przypuszcza się, że powierzchnie aktywne mają korzystny wpływ na biogodność wprowadzonych do ustroju ludzkiego biomateriałów [9-12].

W związku z tym, że obecnie niewielu badaczy zajmuje się tego typu eksperymentami, w celu zaprezentowania potencjału zeta, niezbędny jest opis zjawisk elektrycznych na granicy faz. Teoria i praktyka wskazują, że oddziaływania elektryczne mają istotne znaczenie w procesach zachodzących w układach budowy mineralogicznej układu kostnego.

Opisując strukturę i stabilność układów koloidalnych należy zwrócić uwagę, że cechą charakterystyczną cząstki koloidalnej – szczególnie koloidu fazowego – jest zaadsorbowany w postaci jonu ładunek powierzchniowy, który jest równoważony elektrostatycznie przez warstwę przeciwjonów znajdującą się w ośrodku dyspersyjnym. Cząstka koloidalna i warstwa przeciwjonów tworzą tzw. micellę. Ładunki powierzchniowe cząstki, znajdujące się w warstwie przeciwjonów w ośrodku dyspersyjnym, tworzą tzw. podwójną warstwę elektryczną. Ładunek elektryczny cząstki może być dodatni lub ujemny w zależności od tego jakie jony - kationy czy aniony - przeważają w warstwie adsorpcyjnej. Ładunek elektryczny może pojawiać się w wyniku powierzchniowej reakcji chemicznej, dysocjacji elektrokinetycznej grup funkcyjnych oraz oddziaływań elektromechanicznych. Miarą układu koloidalnego jest potencjał elektrokinetyczny. Występuje on między warstwą sztywną, a warstwą dyfuzyjną.

Istnieje wiele modeli opisujących warstwę podwójną. Mają one różny stopień skomplikowania i w różnym stopniu oddają one własności elektryczne na granicy faz. Z bogatej literatury dotyczącej elektrycznej warstwy podwójnej wynika, że własności elektryczne granic fazowych można opisać modelem Helmholtza, opartym na właściwości kondensatora płaskiego lub modelem Gouya-Chapmana, opartym na

rozmytej warstwie elektrycznej. Można również zastosować zmodyfikowaną kombinację obu modeli.

Obecnie wytwarzanie bioceramicznych kompozytów pozwala na sterowanie struktury i tekstury biomateriału, jak również prowadzi się modyfikacje powierzchni, w taki sposób, żeby w końcowym efekcie uzyskać optymalne, wcześniej zaprogramowane właściwości, w tym również potencjał elektrokinetyczny zeta [13]. Polega to na wprowadzeniu na powierzchnię implantu odpowiedniego dla danej tkanki potencjału elektrokinetycznego. Zmodyfikowany w ten sposób materiał charakteryzuje się znacznie lepszymi właściwościami adsorpcyjnymi. Zjawisko to może mieć podstawowy wpływ na rodzaj i ilość komórek, adsorbowanych na powierzchni wszczepu w pierwszym okresie po implantacji.

Najbardziej miarodajnym określeniem biogodności materiałów ceramicznych jest obraz histologiczny na granicy implant/kość. We wczesnym okresie pojawiają się komórki zapalne typu limfocyta i komórki mezenchymalne. Równocześnie obserwuje się występowanie fibrocytów, fibroblastów oraz osteoblastów i osteocytów, które następnie przekształcają się w tkankę kostną ściśle przylegającą do ściany wszczepu. Takie implanty nazywa się osteoindukcyjnymi [14].

Podstawowe znaczenie dla oceny biomateriałów mają przedkliniczne badania eksperymentalne na zwierzętach. Dlatego podjęto badania odczynu tkanek w odniesieniu do dwóch rodzajów ceramiki korundowej – litej i litej silanowanej o aktywnej powierzchni. Wykonano badania porównawcze reakcji tkanki kostnej po implantacji ceramiki litej i silanowanej, oraz oceniano wpływ ładunku elektrycznego i zmianę potencjału zeta na odczyn tkankowy [15].

MATERIAŁY I METODY BADAŃ

Charakterystyka i otrzymywanie materiału

Ceramikę litą i litą silanowaną o składzie chemicznym CaO-2%, MgO-3%, Al₂O₃-95% wypalano w temp. 1500°C. Obie ceramiki otrzymano metodą zol-żel.

Do matrycy ceramicznej o wyżej wymienionym składzie chemicznym, dodawano od 10 do 30 % zolu krzemionkowego z dodatkami kontrolowanego żelowania. Próbk

prasowano pod ciśnieniem 15 MPa. Tworzywo zamrażano szokowo w temperaturze -68°C przez 2 h, a następnie wypalano w temp. 1500°C przez 0,5 h.

Ceramikę litą o aktywnej powierzchni otrzymywano w procesie silanowania. Powierzchnia implantów modyfikowana była N- β -aminoetylo- δ -amino-propylotrimetoksylanem $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3(\text{OCH}_3)_3\}$, produkowanym pod nazwą Z6020, w sposób opisany poniżej.

Wypalone w temp. 1500°C implanty ceramiczne, poddawano procesowi silanowania zwilżając je 0,12% (objętościowo) roztworem silanu w izopropanolu. Implanty pozostawiano na 72h w temperaturze otoczenia. Roztwór dekantowano, a implanty suszono w temp. 60°C przez 3h. Następnie wielokrotnie odmywano je do uzyskania roztworu o pH około 7, w którym były zanurzone.

Próbki ceramiki litej i litej silanowanej przygotowano w postaci walców o wymiarach dł. 10 mm i śr. 3 mm. Powierzchnie ceramiki litej i litej silanowanej były zbite i gładkie, a wyglądem przypominały powierzchnię związanego cementu. Miejscami obserwowano drobne nieregularne spękania.

Na powierzchni ceramiki litej i litej silanowanej oglądanej w mikroskopie skaningowym, przy powiększeniu 2000x, widoczne były liczne ziarna o nieregularnym kształcie i różnej wielkości. Ziarna te ułożone były miejscami ściśle, a miejscami luźno względem siebie. Mniejsze ziarnistości wykazują bardziej owalny i regularny kształt, natomiast ziarna średniej wielkości oraz duże są bardziej nieregularne, a ich brzegi są ostre. Niektóre ziarna są zlepione i tworzą różnej wielkości konglomeraty.

Steryлизację kształtek ceramicznych przeprowadzono w sterylizatorze gazowym GST-21, przy użyciu tlenu etylenu GS-1 przez 4 h. Kształtki wietrzono przez 3 tygodnie.

Badania doświadczalne na zwierzętach

Badania na zwierzętach zostały wykonane za Zgodą Komisji Etycznej Nr KEBN 103/99. Badanie miejscowych odczynów tkanki kostnej przeprowadzono na 20 królikach obojga płci, rasy białej nowozelandzkiej, o masie ciała 3,2-3,5 kg.

Króliki do zabiegu znieczulano w następujący sposób:

Premedykacja: Chloropromazine w dawce 5-10 mg/kg m.c./i.m. (preparat Trankwilina – Biowet-Puławy), Atropini sulfas w dawce 0,1 mg/kg m.c.s.c. (preparat Atropinum sulfuricum- Polfa Warszawa).

Sen podstawowy: Pentobarbital w dawce max. 30 mg/kg m.c. podawany i.v. wg efektu działania (preparat Vetbutal-Biowet-Puławy). Dodatkowo przeciwbólowo królikom podawano noraminofenazol w dawce 0,5-2,5 ml i.m. (preparat Biovetalgin-Biowet-Puławy).

Operacja: Pole operacyjne odkażano preparatem alkoholowym dodesept (Prevacare - prod. ARCANA –Austria). Cięcie skóry wykonywano po przyśrodkowej stronie podudzia tylnej łapy królika, na wysokości guzowatości kości piszczelowej. Po rozdzieleniu na tępo ścięgien, przecinano okostną odsłaniając kość piszczelową. W miejscu jej guzowatości nawiercano 2 otwory odpowiedniej wielkości i wprowadzano implanty: do kości lewej – ceramikę litą, do kości prawej ceramikę litą silanowaną. Skórę zaszywano pojedynczymi szwami.

Badania pooperacyjne

Badania pooperacyjne obejmowały obserwacje kliniczne ogólnego stanu zdrowia zwierząt i przebiegu gojenia ran pooperacyjnych. Szczególną uwagę zwracano na ruchliwość kończyn w stawie biodrowym oraz ich kształt i wielkość.

Badania sekcyjne

Eutanazję królików przeprowadzono przez podanie Pentobarbitalu w dawce maksymalnej 200 mg/kg m.c., a następnie wykonano dyslokację kręgów szyjnych. Sekcje królików wykonano 12, 26, 36 i 54 tygodnie po operacji, przeznaczając po 5 zwierząt na każdy termin. W czasie przeprowadzonych sekcji zwracano uwagę na wygląd mięśni przylegających i pokrywających wszczep, a po ich odpreparowaniu - na wygląd kości w bezpośrednim sąsiedztwie implantu. Określano także ścisłość przylegania wszczepu do kości i jego pokrycie okostną. Badaniem makroskopowym oceniano również stan narządów wewnętrznych jamy brzusznej i klatki piersiowej. W czasie sekcji wykonywano zdjęcia rentgenowskie i pobierano wycinki kości wraz z implantem do badań patomorfologicznych, oraz pobierano implanty do badań w celu określenia wartości potencjału zeta.

Badania radiologiczne

Rentgenogramy wykonano za pomocą aparatu Rtg o ogniskowej 0,3 x 0,3 mm, napięciu 50 KV i 2,5 m AS, z odległości 143 cm, z użyciem uniwersalnej folii wzmacniającej, przy ułożeniu wypreparowanych kończyn tylnych królików bezpośrednio na kasecie Rtg.

Badania mikroskopowe

Kości wraz z implantem utrwalano w 8% roztworze formaldehydu mrówkowego, odwapniano w roztworze kwasu mrówkowego i kwasu solnego, a następnie odwadniano w szeregu acetonowym i zatapiano w bloczki parafinowe. Preparaty barwiono HE i metodą van Gieson.

Badania potencjałów Zeta

Pomiary wykonywano na aparacie Zeta Potential Analyzer NICOMP 380/ ZLS. Parametry pomiaru: pole elektryczne 8-10 V/cm, czas pomiaru od 20 do 120 s, intensywność padającej wiązki światła laserowego ok. 200 kHz, temp. pomiaru 23 ° C.

WYNIKI BADAŃ

Obserwacje kliniczne królików

Wszystkie operowane króliki przeżyły zabieg. Rany skórne wygoiły się przez rychłozrost. Operowane kończyny miały prawidłową wielkość, kształt i ruchomość w stawie biodrowym i kolanowym, a stan mięśni operowanych kończyn wykazywał prawidłowe napięcie.

Badania makroskopowe

W czasie wykonywanych sekcji królików, w tkance kostnej otaczającej implanty z ceramiki litej i litej silanowanej, nie stwierdzono różnic w obrazie makroskopowym.

12 tygodni po implantacji, kość w bezpośrednim sąsiedztwie implantów nie wykazywała żadnych odchyleń od normy. Po przecięciu poprzecznym kości widoczny był

wszczep, tkwiący zarówno w części zbitej, jak i w jamie szpikowej. Kość związana była silnie z powierzchnią implantu. Szpik w miejscu kontaktu z ceramiką był prawidłowy. 26 i 36 i 54 tygodnie po implantacji u większości królików implanty były niewidoczne, pokryte okostną. W celu zlokalizowania implantów wykorzystano zdjęcia rentgenowskie.

Badania mikroskopowe

W grupie z ceramiką litą, 12 i 26 tygodni po implantacji, przestrzenie po usuniętych implantach ograniczone były tkanką kostną, a miejscami tkanką łączną włóknistą. Tkanka łączna zbudowana była z licznych włókien klejorodnych, mniej licznych fibrocytów i pojedynczych osteoblastów. 36 i 54 tygodnie po implantacji, przestrzenie po usuniętych implantach otaczała tkanka kostna, w której widoczne były kanały Haversa (ryc. 1 i 2).

W grupie z ceramiką litą silanowaną 12, 26, 36 i 54 tygodnie po implantacji, widoczne były przestrzenie po usuniętych implantach otoczone tkanką kostną. W miejscach gdzie implant stykał się z jamą szpikową obserwowano tworzenie się blaszek kostnych (ryc. 3 i 4).

Badania radiologiczne

W grupie z ceramiką litą oraz w grupie z ceramiką litą silanowaną, wyniki badań radiologicznych były bardzo podobne. Wokół implantów - w warstwie korowej, widoczna była kostnina. Wzdłuż zacinienia implantów obserwowano odczyny osteolityczne. Na powierzchni kości, widoczne były odczyny okostnowe w postaci „cebulkowatych” nawarstwień. 36 i 54 tygodnie po implantacji we wszystkich przypadkach miejsca implantów wypełnione były kostniną..

Badania potencjałów zeta

36 tygodni po implantacji ceramiki litej, badania potencjału zeta przeprowadzone z tkanki kostnej królika wykazały, że zmiany potencjału elektrokinetycznego na powierzchni implantu wahały się w granicach od -24 mV do -19 mV (wykres 1), a 54 tygodnie po implantacji wahały się w zakresie od 24 mV do 15 mV (wykres 2).

36 tygodni po implantacji w grupie z ceramiką litą silanowaną, zaobserwowano nieznaczne wahania wartości potencjału elektrokinetycznego w granicach od $-20,59$ mV do

-20,56 mV (wykres 1). Pomiary wykonane 54 tygodnie po implantacji wahały się w zakresie od -20 mV do -17,5 mV (wykres 2).

OMÓWIENIE

Wyniki badań radiologicznych, makroskopowych i mikroskopowych po implantacji w tkankę kostną ceramiki litej i litej silanowanej przedstawiono w tabeli 1, 2.

W obrazie radiologicznym po implantacji obu rodzajów ceramiki, obserwowano występowanie w różnym nasileniu odczynów osteolitycznego i okostnowego, w zależności od typu ceramiki i czasu po implantacji. Odczyn osteolityczny w przypadku ceramiki litej występował do 36 tygodnia, a w przypadku ceramiki litej silanowanej do 26 tygodnia po implantacji. Niezależnie od rodzaju ceramiki i czasu badania nie stwierdzono odczynu osteosklerotycznego (tab. 1).

Po implantacji ceramiki litej, stwierdzano do 26 tygodnia występowanie wokół implantu małych wysepek tkanki łącznej włóknistej, która nie występowała w okresie odległym tj. 36 i 54 tygodnie po implantacji. Natomiast w przypadku ceramiki litej silanowanej we wszystkich terminach, począwszy od 12 tygodnia po implantacji, widoczna była tkanka kostna ściśle przylegająca do implantu (tab. 2).

Badania potencjału elektrokinetycznego zeta, po 36 i 54 tygodniach przebywania w tkance kostnej królika wykazały, że wartości tego potencjału pierwotnie wprowadzone na powierzchnię wszczepów utrzymywały się na stabilnym poziomie. Potwierdza to, że aktywacja powierzchni implantów, poprzez silanowanie metodą zol-żel, pozwala na wprowadzanie zaplanowanego potencjału zeta, w zależności od potencjału charakterystycznego dla danego rodzaju tkanki.

WNIOSKI

1. Silanowanie ceramiki litej umożliwia uzyskanie zaprogramowanej wielkości potencjału elektrokinetycznego, który po 54 tygodniowym okresie implantacji nie zmienił swej wartości.
2. Ceramika z potencjałem elektrokinetycznym zeta, o wartości zbliżonej do własnego potencjału elektrokinetycznego kości, łagodzi odczyn tkankowy zwiększając biogodność ceramiki litej silanowanej.

LITERATURA

- [1]. Łaskowiec J., Michalik R.: Zagadnienia teoretyczne i aplikacyjne w implantach. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej. Gliwice 2002.
- [2]. Tredway W.K., Risband S.H.: J. Nou. Crystal. Solids (1988), 100, 278-283.
- [3]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Wnukiewicz J., Sokołowski A., Pietras M.: Potencjał elektrokinetyczny w Układach Płynny Ustrojowe/Implanty. Prace Naukowe Instytutu Technologii organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej. (2000), 22, 249-252.
- [4]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Zubiński J., w: Materiały kompozytowe - właściwości, wytwarzanie, zastosowanie, I Konf. Naukowa, Prace Nauk. Inst. Budownictwa PWr., Ser. Konferencje, Wrocław 1997.
- [5]. Hench L.L. Bioceramics. J. Am. Ceram. Soc. 1998, 81, 21-32.
- [6]. Badura R., Buczek A., Kotz J. i inni. Badania biozgodności nowej generacji cementów kostnych. Szkło i Ceramika (1998), 6, 64-70.
- [7]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Gasperowicz A., Cibis E., Gancarek Z.: Ceramiczne nośniki do immobilizacji drobnoustrojów w procesach fermentacyjnych. Prace Naukowe Instytutu Budownictwa Politechniki Wrocławskiej (1999), 75, 25-40.
- [8]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Gasperowicz A., Wnukiewicz J., Sokołowski A.: Modyfikacja Powierzchni Tworzyw Bioceramicznych poprzez zmianę ich potencjału zeta do zastosowań w chirurgii. Annales Academiae Medicae Silensis, Materiały IV konferencji. Biomateriały i mechanika w stomatologii. (2000), 321-326.
- [9]. Holmes R.E. et al.: Bone regeneration in on lay replemineform hydroxypatie implants. Biomed. Mater. Res. Symp. Trans. (1978), 2, 180-181.
- [10]. Overgaard S., Lind M., Glerup H., Grundvig S., Bunger C., Soballe K.: Hydroxyapatite and fluoropatie coatings for fixation of weight loaded implants. Clin. Orthop. 1997, 336, 286-296.
- [11]. Summer D.R., Galante J.O.: Evarts C.M., editors. Sugery of the musculoskeletal System. 2 nd. Ed. New York: Churchill Livingstone. (1990), 151-176.
- [12]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Sokołowski A., Wnukiewicz J., Staniszevska-Kuś J.: Potencjały elektrokinetyczne na granicy faz: Implant - płyny ustrojowe. Inżynieria Biomateriałów. (2001), 13, 12-15.

- [13]. Zboromirska-Wnukiewicz B., Sokołowski A., Wnukiewicz J.: Electric Phenomena Occurring on Phase Boundaries of the ceramic material and tissue cells. *Przegląd Elektrotechniczny. Zeszyt Specjalny*, (2001), LXXVII, 336-339.
- [14]. Staniszevska-Kuś J., Paluch D., Pielka S., Ślósarczyk A., Garcarek J.: Zastosowanie dwufazowej ceramiki hydroksyapatytowej i whithlockitowej jako materiału osteoindukcyjnego. *Badania doświadczalne. Acta of Bioengineering and Biomechanics*. (2001), 3, Supplement 1, 221-230.
- [15]. PN-EN 30993-6. Biologiczna ocena wyrobów medycznych. *Badania miejscowej reakcji po implantacji*. Grudzień 2000.

Adres autorów:

Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów

Katedra Chirurgii Urazowej Akademii Medycznej

ul. Poniatowskiego 2 , 50-326 Wrocław

tel. (71)322-63-10; e-mail: biomat@cheksp.am.wroc.pl

Ceramic corundum materials with modified surface as implantation materials

Robert Lewandowski¹, Roman Rutowski², Danuta Paluch¹, Jolanta Staniszevska– Kuś¹,
Beata Zboromirska–Wnukiewicz³, Adam Sokołowski³, Bogusława Żywicka¹, Jan
Wnukiewicz⁴,

¹ Department of Experimental Surgery and Biomaterials of Wrocław Medical University

² Clinic of Traumatology and Arm Surgery of Wrocław Medical University

³ Institute of Electrical Engineering in Wrocław

⁴ Chair and Clinic of Maxillary – Facial Surgery of Wrocław Medical University

Summary

Investigations on implants have proved that not only the kind of material structure, but also the surface character of grafts influences the local reaction of biomaterials. In recent years electrochemical reactions on implants surface leading to the so called zeta potential arouse interests. Applications of these properties has made us carry on experiments on use of biomaterials with active potential on their bio-compatibility.

The aim of this work is evaluation of influence of electrical charge with zeta potentials character on the local reaction of bone tissue after implantation. Two kinds of ceramics were used in experiments: solid and solid – silane with active surface. Implantation experiments were made on 20 rabbits. Selections were carried of 12, 26, 36 and 54 weeks after implantation of the tested materials.

After implantation of solid ceramics, not only bone tissue but also fibrous tissue was observed around the graft. But in case of solid silane ceramics, in all terms of tests, bone tissue tightly sticking to the implant was observed around the graft.

Investigations of electrokinetic zeta potential carried out 36 and 54 weeks after implantation showed that the values of that potential originally introduced on the grafts surface were maintained on stable level. The carried out investigations confirmed that activation of implants surface through silaning with sol – gel method allows to introduce the planned zeta potential depending on the characteristic for a given kind of tissue.

Key words: solid ceramics, solid – silane ceramics, zeta potential, bone tissue reaction

INTRODUCTION

Reconstructive surgery of osseous system constitutes the most representative realm of use of biomaterials as regards quantity and quality. Complicated conditions of bionics of movement and environment of osseous tissue require use of materials with specific physicochemical and functional properties.

To ensure proper compatibility of implant with the environment of piezoelectrics and organic semi-conductors, to obtain proper connection implant–bone, proper physicochemical state of the surface of material implanted into an organism should be ensured [1].

During production of bioceramic composites, there appears necessity of introducing specific binders and using non-typical technological methods which allow their precise forming, and in the final effect achieving composite with optimally programmed properties [2– 4].

Production of substitute with the same parameters as bone is very difficult. In the majority of publications the bone is treated as constructing material anatomically differentiated as far as size and shape are concerned. Depending on the function of implant in the organism the main accent is put on its textural structure, that is size and shape of pores [5

–7]. Biomaterials use in reconstructive surgery characterise with similar microstructural properties, way of surface finishing and chemical properties.

The results of implants investigations lead researches to conclusions, that not only the kind of material structure but also the character of grafts surface influences the local reaction around biomaterial. Investigations on biomaterials and its surface were carried out not only comparing them with other implants but also in dependance on using different technologies of their production. In recent years electrochemical reactions on implant surface leading to appearance of electrical phenomena on phase borders and of the so-called zeta potential arouse interest of researches. Investigations of these phenomena and possibility of measuring zeta potential encourage to undertake researches on implants with active surfaces [2, 5, 8]. It is supposed that active surfaces has advantageous influence on biocompatibility of biomaterials introduced into human organism [9–12].

Because of the fact that nowadays not many researchers deal with experiments of that type, description of electrical phenomena on the phases borders is necessary to present zeta potential. Theory and practice show that electrical influences are essential in processes appearing in systems of mineralogical structure of osseous system.

Describing structure and stability of colloidal systems attention should be paid that characteristic of colloidal particle – particularly of a phase colloid – is adsorbed as ion surface charge, which is electrostatically balanced by counter – ions layer found in dispersion medium. Colloidal particle and counter – ions layer create so-called micelle. Surface charges of particle found in counter – ion layer in dispersion medium create so-called double electrical layer. Electrical charge of particle may be positive or negative depending which ions – cations or anions – prevail in the adsorption layer. Electrical charge may appear as the result of surface chemical reaction, electrokinetical dissociation of functional groups and electromechanical reactions. Electrokinetical potential is the measure of colloidal system. It appears between the stiff and diffusion layer.

There are many models describing a double layer. They have different degree of complication and in different degree they give away electrical properties on phases borders. From the rich literature dealing with electrical double layer results that electrical properties of phase borders can be described with Helmholtz model based on properties on flat condenser or with Gouy–Chapman model based on washed away electrical layer. Modified combination of both models can be also used.

Nowadays production of bioceramic composites allow to steer structure and texture of biomaterial and also modifications of structure are carried out in such a way to achieve, in the final effect optimal, earlier programmed properties including also electrokinetical zeta potential [13]. It depends on introducing on the implant surface electrokinetical potential proper of a given tissue. Material modified in that way characterises with much better adsorption properties. That phenomena can have the basic influence on the kind and amount of cells adsorbed on the graft surface in the first period after implantation.

Histological picture on the border implant bone is the most competent marking of biocompatibility of ceramic materials. In the early period there appear inflammatory cells of lymphocyte and mesenchyme cells. Simultaneously appearance of fibrocytes, fibroblasts and osteoblasts as well as osteocytes which next change into bone tissue tightly sticking to the graft wall is observed. Such implants are called osteoinductive [14].

Preclinical experiments on animals have basic importance for estimation of biomaterials. That's why investigations of tissue reaction in relation to two kinds of corundum ceramics – solid and solid–silane with active surface were undertaken. Comparative investigations were made of reaction of bone tissue after implantation of solid and silane ceramics and estimated the influence of electrical charge and change of zeta potential on tissue reaction [15].

INVESTIGATION MATERIALS AND METHODS

Characteristic and obtention of materials

Solid and solid-silane ceramics with chemical construction $\text{CaO} - 2\%$, $\text{Mg} - 3\%$, $\text{Al}_2\text{O}_3 - 95\%$ was burned out in temp. 1500°C . Both ceramics were obtained with zol-gel method.

From 10 % to 30 % siliceous zol with additions of controlled gelling was added to a ceramic matrix with the above mentioned chemical constitution. Samples were pressed under pressure of 15 MPa. The material was shock frozen in temperature -68°C for 2 h, and next burned out in temp. 1500°C for 0,5 h.

Solid ceramics with active surface was obtained in the process of silaning. Implants surface was modified with N- β -aminoethylo- δ -aminopropylotrimetoxysilane $\{\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3(\text{OCH}_3)_3\}$, produced with the name Z6020, in the way described below.

Ceramic implants burnt out in temp. 1500°C were subjected to the process of silane wetting them with 0,12% (as regards volume) silane solution in isopropanol. The implants were left for 72 h in environment temp. The solution was decanted and the implants were dried in temp 60°C for 3 hours. Next, they were washed many times until solution with pH about 7 in which they were dipped was obtained.

Samples of solid and solid-silane ceramics were prepared in the form of cylinders 10 mm long and 3 mm of diameter. The surfaces of solid and solid-silane ceramics were dense and smooth and resembled in appearance surface of bounded cement. Tiny, irregular cracks were observed locally.

On the surface of solid and solid-silane ceramics observed in a scanning microscope with magnitude 2000 x, numerous grains with irregular shape and various size were seen. The grains were arranged locally tightly and locally loosely. Smaller granularities have more oval and regular shape but medium-sized and large grains are more irregular and their edges are sharp. Some grains are stuck together and create conglomerates with various sizes.

Ceramic moulders sterilization was performed in a gas sterilizer GST-21 with use of ethylene oxide GS-1 for 4 h. The moulders were ventilated for 3 weeks.

Experiments on animals

The experiments on animals were made with Consent of Ethical Board № KEBN 103/99. Investigation of local reactions of bone tissue were made on 20 rabbits, males and females of white New Zealand breed with body weight $3,2 \div 3,5$ kg.

The rabbits, for tests were anaestheized in the following way:

Premedication: Chlorpromazine in doses $5 \div 10$ mg/kg m.c./i.m. (Trankwilin – Biowet – Puławy preparation), Atropini sulfas in dose 0,1 mg / kg m.c.s.c. (Atropinum sulfuricum – Polfa Warsaw preparation).

Basic sleep: Pentobarbital in max dose 30 mg/kg m.c. administered i.v. according to the effect of activity (Vetbutal – Biowet – Puławy preparation). Additionally analgetically the rabbits were administered noraminofenazol in dose $0,5 \div 2,5$ ml i.m. (Biovetalgin – Biowet – Puławy preparation).

Surgery: Operative field was disinfected with alcoholic dodesept (Prevacare – prod.

By ARCANA – Austria). Skin cut was made along medial side of rabbit's hind shank at the level of tuberosity of tibia. After blunt dissection of tendons periosteum was cut exposing the tibia. At the place of its tuberosity 2 holes of proper size were drilled and implants were

introduced: to the left bone – solid ceramics, to the right bone—solid—silane ceramics. Skin was sutured with single stitches.

Postoperative examinations

Postoperative examinations included clinical observations of the general state of animals health and of the course of postoperative wounds healing. Particular attention was paid to mobility of limbs at hip joint as well as their shape and size.

Postmortem examinations

Euthanasia of rabbits was made through administration of Pentobarbital in max. dose 200mg/kg m.c., and next dislocation of cervical vertebrae was made. Sections of rabbits were made 12, 26, 36 and 54 weeks after the operation, assigning 5 animals for each term. During sections attention was paid to the appearance of muscles adhering and covering graft, and after their preparation – to the appearance of bone in the near vicinity of the implant. Precision of the adhesion of the graft to the bone and its covering with periosteum was also determined. The state of internal organs of the abdominal cavity and thorax was also estimated with macroscopic examination. During sections X – ray pictures were made and bone segments with the implant were taken for pathomorphological examinations and implants were taken for tests to determine zeta potential.

Radiological investigations

Roentgenograms were made with Rtg apparatus with focal length 0,3 x 0,3 mm, tension 50 kV and 2,5 m AS, from distance 143 cm with use of universal foil with positioning of strengthening the prepared hind legs of rabbits directly on a Rtg cassette.

Microscopic investigations

Bones with implant were preserved in 8% solution of formic formaldehyde, were decalcificated in solution of formic acid and hydrochloric acid and next dehydrated in acetone series and submerged in paraffin blocks. Preparations were stained with HE and van Gieson method.

Zeta potentials investigation

Measures were made on Zeta Potential Analyzer NICOMP 380/ZLS. Parameters of measure: electrical field $8 \div 10$ V/cm, measure time from 20 to 120 s, intensity of incident beam laser light about 200 kHz, measure temp 23°C.

INVESTIGATIONS RESULTS

Clinical observations of rabbits

All operated rabbits survived the surgery. Skin wounds healed by first intention. The operated limbs had proper size, shape and mobility in the hip and knee joint, and the state of operated muscles of limbs showed correct tension.

Macroscopic investigations

During sections of rabbits in the bone tissue surrounding implants from solid and solid–silane ceramics difference, in macroscopic picture were not observed.

12 weeks after implantation, the bone in the near vicinity of implants did not show any deviations from the norm. After cross – cutting of the bone, the graft was seen both in the dense part and in the marrow cavity. The bone was bound tightly with the surface of the implant. Marrow in the place of contact with ceramics was correct. 26, 36 and 54 weeks after implantation implants were not seen, covered with periosteum in most rabbits. X–ray pictures were used to localize implants.

Microscopic investigation

In the group with solid ceramics, 12 and 26 week after implantation, spaces after the removed implant were limited by bone tissue, and in places by fibrous tissue. Connective tissue consisted of numerous collagen fibres, less numerous fibrocytes and single osteoblasts. 36 and 54 weeks after implantation, the spaces after removed implant were surrounded by bone tissue where Havers canals were seen (fig. 1 and 2).

In the group with solid–silane ceramics 12, 26, 36 and 54 weeks after implantation, spaces after the removed implant surrounded with bone tissue were seen. In the places where the implant was connected with marrow cavity creation of lamellas of bone were seen (fig. 3 and 4).

Radiological investigation

In the group with solid ceramics and in the group with solid–silane ceramics the results of radiological investigations were very similar. Around the implants – in the cortical layer, callus was seen. Along shading of implants osteolytic reactions were seen. On the surface of bone periosteum reactions were seen in the form of “onion–like” stratifications. 36 and 54 weeks after implantation in all cases places of implants were filled with callus.

Zeta potentials investigations

36 weeks after implantation of solid ceramics, zeta potential investigations made from bone tissue of rabbit showed that electrokinetical potential changes on the surface of implant balanced in the limits from -24 mV to -19 mV (graph 1) and 54 weeks after implantation they balanced in the range from 24 mV to 15 mV (graph 2).

36 weeks after implantation in the group with solid–silane ceramics, tiny balances of electrokinetical potential values in the limits from $-20,59\text{ mV}$ to $-20,56\text{ mV}$ (graph 1). Measures made 54 weeks after implantation balanced in the range from -20 mV to $-17,5\text{ mV}$ (graph 2).

DISCUSSION

The results of X–ray investigations, macroscopic and microscopic after implantation of solid and solid–silane ceramics in bone tissue are presented in table 1 and 2.

In the X-ray picture after implantation of both kinds of ceramics, there appeared osteolytic and periosteum reactions of different intensity depending on the type of ceramics and time after implantation. Osteolytic reaction in the case of solid ceramics appeared till 36th week, and in the case of solid silane ceramics till 26th week after implantation. Independently on the kind of ceramics and time of investigation, osteolytic reaction was not observed (tab.1).

After implantation of solid ceramics, small islets of fibrous tissue were observed around the implant till 26th week, which did not appear in the distant period, that is, 36 and 54 weeks after implantation. But, in the case of solid-silane ceramics in all terms beginning with 12th week after implantation, bone tissue tightly sticking to the implant was seen (tab. 2).

Electrokinetical zeta potential investigations after 36 and 54 weeks in bone tissue of rabbit showed that the values of that potential originally introduced on the surface grafts were on a stable level. It confirms that activation of implants surface through silaning with sol-gel method, allows to introduce the planned zeta potential, depending on the potential characteristic for a given kind of tissue.

CONCLUSIONS

1. Silaning with solid ceramics allows to obtain the programmed size of electrokinetical potential, which after 54 week implantation did not change its value.
2. Ceramics with electrokinetical zeta potential with value similar to its own electrokinetical potential of bone, mitigates tissue reaction increasing biocompatibility of solid-silane ceramics.

Tabela 1. Ocena odczynów tkanki kostnej na podstawie obrazu radiologicznego w zależności od rodzaju ceramiki, po wszczepieniu do kości piszczelowej królika w różnych terminach

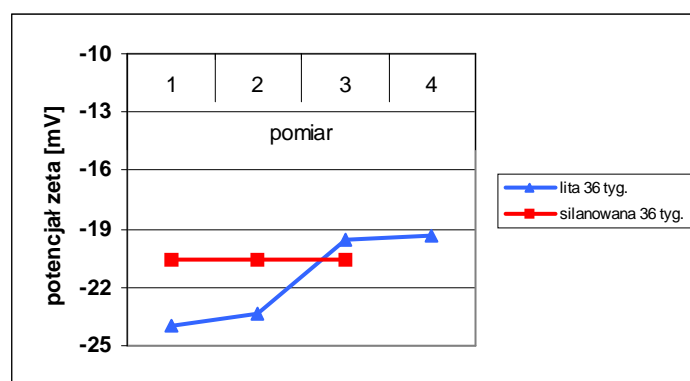
Table 1. Estimation of bone tissue reactions on the basis of X-ray picture depending on the kind of ceramics after implantation into rabbit's tibia in different terms.

Rodzaj ceramiki/ kind of ceramics	Odczyn osteolityczny Osteolytic reaction			Odczyn osteosklerotyczny Osteosclerotic reaction			Odczyn okostnowy Periosteum reaction		
	Termin badania – tygodnie Investigation term – weeks			Termin badania – tygodnie Investigation term – weeks			Termin badania – tygodnie Investigation term – weeks		
	26	36	54	26	36	54	26	36	54
ceramika lita/ solid ceramics	+	+	-	-	-	-	+	-	-
ceramika lita silanowana/ solid-silane ceramics	+	-	-	-	-	-	+	-	+

Tabela 2. Rodzaj tkanki wokół implantu w zależności od rodzaju ceramiki oraz czasu po implantacji

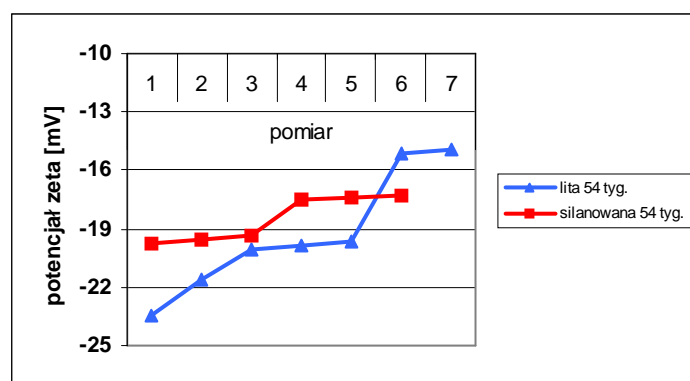
Table 2. Kind of tissue around implant depending on the kind of ceramics and time after implementation

Rodzaj ceramiki/ kind of ceramics	Tkanka/Tissue							
	Tkanka włóknista/ Fibrous tissue				Tkanka kostna/ Bone tissue			
	Termin badania – tygodnie/ Investigation term – weeks				Termin badania – tygodnie/ Investigation term – weeks			
	12	26	36	54	12	26	36	54
ceramika lita/ solid ceramics	+	+	-	-	+	+	+	+
ceramika lita silanowana/ solid-silane ceramics	-	-	-	-	+	+	+	+



Wykres 1. Wartości potencjału elektrokinetycznego zeta 36 tygodni po implantacji ceramiki litej i litej silanowanej do tkanki kostnej królika. Pomiar Apar. Zeta Pot. Anal. NICOMP

Graph 1. Electrokinetic zeta potential values 36 weeks after implantation of solid and solid–silane ceramics into bone tissue of rabbit. Measure Apar: Zeta Pot. Anal. NICOMP



Wykres 2. Wartości potencjału elektrokinetycznego zeta 54 tygodnie po implantacji ceramiki litej i litej silanowanej do tkanki kostnej królika. Pomiar Apar. Zeta Pot. Anal. NICOMP

Graph 2. Electrokinetic zeta potential values 54 weeks after implantation of solid and solid–silane ceramics into bone tissue of rabbit. Measure Apar: Zeta Pot. Anal. NICOMP

Ryc.1. Obraz mikroskopowy 12 tygodni po implantacji ceramiki litej w tkankę kostną królika. W centrum przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona tkanką kostną. Barw. HE. Pow. 40x

Fig. 1. Microscopic picture 12 weeks after implantation of solid ceramics into bone tissue of rabbit. In the centre – space after removed implant limited with bone tissue. Stain HE. Magn. 40 x.

Ryc.2. Obraz mikroskopowy 26 tygodni po implantacji ceramiki litej w tkankę kostną królika. Po stronie prawej widoczna przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona pasmem włóknistej tkanki łącznej. Barw. HE. Pow. 140x

Fig. 2. Microscopic picture 26 weeks after implantation of solid ceramics into bone tissue of rabbit. On the right side – space after removed implant limited with a band of fibrous tissue. Stain HE. Magn. 40 x.

Ryc. 3. Obraz mikroskopowy 12 tygodni po implantacji ceramiki litej silanowanej w tkankę kostną królika. Po stronie lewej przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona tkanką kostną. Barw. HE. Pow. 140x

Fig. 3. Microscopic picture 12 weeks after implantation of solid–silane ceramics into bone tissue of rabbit. On the left side – space after removed implant limited with bone tissue. Stain HE. Magn. 140 x.

Ryc. 4. Obraz mikroskopowy 26 tygodni po implantacji ceramiki litej silanowanej w tkankę kostną królika. U góry przestrzeń po usuniętym implancie ograniczona tkanką kostną. Barw. HE. Pow. 140x

Fig. 4. Microscopic picture 26 weeks after implantation of solid–silane ceramics into bone tissue of rabbit. On the top – space after removed implant limited with bone tissue. Stain HE. Magn. 140 x.

.