

# **ZASTOSOWANIE MIKROANALIZY PIERWIASTKOWEJ DO OCENY OSTEOINDUKCJI I OSTEOKONDUKCJI DOKOSTNYCH IMPLANTÓW HYDROKSYAPATYTOWYCH**

Aleksander Dawidowicz<sup>\*</sup>, Stanisław Pielka<sup>\*</sup>, Danuta Paluch<sup>\*</sup>, Jan Kurysko<sup>\*\*</sup>  
Jolanta Staniszevska-Kuś<sup>\*</sup>, Leszek Solski<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów  
Akademii Medycznej we Wrocławiu

<sup>\*\*</sup>Katedra Anatomii i Histologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Akademii Rolniczej we Wrocławiu

---

## **Streszczenie**

Ceramikę hydroksyapatytową (HAp) opartą na fosforanach wapnia, związkach chemicznych będących budulcem naturalnym kości, uważa się obecnie za jeden z lepszych materiałów implantacyjnych w chirurgii kostnej i w stomatologii. HAp jest materiałem słabo rozpuszczalnym i wolno resorbującym się w tkankach. Łatwość łączenia ceramiki hydroksyapatytowej z innymi materiałami stwarza możliwości tworzenia nowych kompozytów, zbudowanych ze związków chemicznych zawierających wapń i łatwiej ulegających resorpcji. Ważnym i dotychczas nie w pełni poznany problemem jest wpływ implantów hydroksyapatytowych na mineralizację tkanki kostnej penetrującej wszczep i tkanki kostnej wokół wszczepu. Namnażanie osteoblastów oraz szybkość budowy beleczek kostnych uzależnione jest między innymi od stężenia wapnia i fosforu.

Celem pracy są porównawcze badania stopnia mineralizacji tkanki kostnej po implantacji hydroksyapatytu (HAp) oraz kompozytów HAp+ $\beta$ fosforan trójwapniowy (HAp+TCP) i HAp+uwodniony siarczan wapnia (HAp+gips), na podstawie mikroanalizy pierwiastkowej.

Badania implantacyjne wykonano na 24 królikach. Sekcje przeprowadzono 5, 9, 11 i 14 tygodni po wszczepieniu badanych materiałów. Wykonana analiza punktowa pierwiastków oraz ich topograficzne rozmieszczenie (mapping) w kościach po implantacji kompozytów, wykazała dość istotne różnice między badanymi wszczepami. Różnice te były najbardziej istotne w 5 i 14 tygodniu i zależały od stopnia resorpcji badanych materiałów.

Na podstawie przeprowadzonych badań makroskopowych i w mikroskopie elektronowym można stwierdzić, że najlepsze właściwości osteokondukcyjne ma kompozyt hydroksyapatytu z  $\beta$  fosforanem

trójwapniowym (HAp+TCP). Największe działanie osteoindukcyjne posiada kompozyt hydroksyapatytu z uwodnionym siarczanem wapnia (HAp+gips).

**Słowa kluczowe:** hydroksyapatyt (HAp),  $\beta$  fosforan trójwapniowy (TCP), uwodniony siarczan wapnia (gips), mikroanaliza pierwiastkowa, osteokondukcja, osteoindukcja

---

## APPLICATION OF ELEMENTAL MICROANALYSIS FOR ESTIMATION OF OSTEOINDUCTION AND OSTEOCONDUCTION OF HYDROXYAPATITE BONE IMPLANTS

---

### Summary

Hydroxyapatite (HAp) ceramics based on calcium phosphates, chemical compounds being natural constructive element of bones is now regarded to be one of better implantation materials in osseous surgery and stomatology. HAp is poorly soluble and slowly resorbing in tissues material. Easiness of connecting of hydroxyapatite ceramics with other materials creates possibilities to produce new composites of chemical compounds containing calcium and easier resorbing. An important and till now not fully known problem is influence of hydroxyapatite grafts on the processes leading to production of calcium and phosphorus ions responsive for mineralization of bone tissue around the graft. Proliferation of osteoblasts and rate of osseous trabeculas production depends, among others, concentration of calcium and phosphorus ions.

The main target of this study was the comparative analysis of the bone mineralisation rate after implantation of hydroxyapatite (HAp) and composites hydroxyapatite +  $\beta$ tricalcium phosphate (HAp+TCP) and hydroxyapatite + calcium hydrosulfate (HAp + gypsum), on the basis of elemental microanalysis.

Implantation studies were carried out on 24 rabbits. Sections were carried out 5, 9, 11 and 14 weeks after implantation of the tested materials. The carried out punctual analysis of the occurring elements and their topographic location (mapping) in bones after implantation showed essential differences among the tested grafts. Those differences were most significant after 5 and 14 weeks and depended on the rate of the tested materials resorption.

On the basis of conducted macroscopic evaluation and scanning microscope assessment we can state that the composite of HAp+TCP showed the best osteoconductive properties, while the best osteoinductive influence was shown by the composite HAp+gypsum.

**Key words:** hydroxyapatite (Hap),  $\beta$ -tricalcium phosphate (TCP), calcium sulfate (gypsum), elemental microanalysis, osteoconduction, osteoinduction

---

## WSTĘP

Wypełnianie ubytków kości odpowiednimi syntetycznymi biomateriałami eliminuje wiele powikłań, które mogą występować przy zastosowaniu materiałów pochodzenia autogenego, allogennego lub ksenogenego [1-4].

Od wielu lat, jako wszczepy, stosuje się ceramikę hydroksyapatytową (HAp). Materiał ten zbudowany jest z fosforanów wapnia, będących naturalnym składnikiem substancji nieorganicznej kości oraz zębów. Hydroksyapatyty odznaczają się najwyższą, spośród znanych obecnie materiałów implantacyjnych, biogodnością i bioaktywnością. Tworzywo hydroksyapatytowe jest materiałem osteokondukcyjnym, a w mniejszym stopniu osteoindukcyjnym, w związku z czym implanty z nich wykonane mogą łączyć się bezpośrednio z kością [4-9].

Badania kliniczne poparte badaniami histologicznymi, potwierdzają pełną biotolerancję i korzystne działanie hydroksyapatytu w procesie gojenia i odbudowy kości oraz jego zdolność do inicjowania i stymulacji procesów odbudowy kości. Po implantacji materiału dochodzi do osteogenezy i powstania warstwy wiążącej powierzchnie wszczepu hydroksyapatytowego z tkanką kostną. Podobna budowa chemiczna materiałów i składnika mineralnego kości, stanowi decydujący warunek przerastania wszczepu przez kość. W ten sposób ceramika hydroksyapatytowa włączana jest w długotrwałe procesy przebudowy kości [6, 10-17].

Wśród nowoczesnych materiałów implantacyjnych szczególne miejsce zajmuje ceramika whitlockitowa  $\beta$  – TCP o wzorze chemicznym  $\beta$  –  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , której odpowiednikiem mineralogicznym jest minerał whitlockit (TCP). Tworzywo TCP wykazuje, podobnie jak tworzywo hydroksyapatytowe, wysoką biogodność. Różni się od niego większą rozpuszczalnością w warunkach in vitro i wynikającą stąd większą skłonnością do resorpcji i biodegradacji w środowisku żywego organizmu. Jako ceramika ulegająca biodegradacji, uważana jest za materiał osteoindukcyjny, stymulujący procesy odbudowy kości [18-21].

Łatwość wiązania się związków hydroksyapatytowych z innymi materiałami stwarza duże możliwości tworzenia nowych kompozytów. Dlatego trwają nieustannie poszukiwania i udoskonalania materiałów stosowanych jako wszczepy kostne [3, 9, 19].

Duże zainteresowanie wzbudza dwufazowa ceramika HAp- $\alpha$ -TCP. Materiał ten mocniej i szybciej wiąże się z kością w stosunku do monofazowego

tworzywa hydroksyapatytowego. Ceramika dwufazowa HAp- $\alpha$ -TCP charakteryzuje się wysokim stopniem osteointegracji [9].

Do biomateriałów resorbowalnych zalicza się także korale i gips. Są to materiały resorbowalne. Według Peltiera, jednym z pierwszych udokumentowanych materiałów zastępujących kość był gips. Został on zastosowany przez Dressmanna w 1892 r. [22]. Gips- $\text{CaSO}_4 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$ , tworzy wraz z wodą połączenie  $\text{CaSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , a jego lekko kwaśny odczyn jest dobrze tolerowany przez organizm. Materiał ten jest całkowicie resorbowalny i zastępowany przez narastającą kość. Jest on jednak mechanicznie bardzo słaby. Z tego powodu może być on dobrym dodatkiem wiążącym do innych, wytrzymałych materiałów i tworzyć z nimi związki kompozytowe stosowane jako implanty [23, 24].

Ze względu na różne właściwości tworzyw i kompozytów hydroksyapatytowych (resorpcja, odpowiednia wytrzymałość mechaniczna), przeprowadzono porównawcze badania stopnia mineralizacji tkanki kostnej wokół wszczepów z hydroksyapatytu HAp oraz kompozytów HAp + gips i HAp + TCP, na podstawie mikroanalizy pierwiastkowej.

## MATERIAŁ

Kompozyty oparte na hydroksyapatytach opracowano w Katedrze Ceramiki Ogniotrwałej, Szlachetnej i Technicznej Wydziału Inżynierii Ceramiki AGH w Krakowie.

Czysty HAp wytrącono na mokro z tlenku wapnia i kwasu ortofosforowego, zachowując odpowiedni stosunek molowy  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Ogrzewając HAp w temp.  $1000^\circ\text{C}$  otrzymano  $\beta$ -fosforan trójwapniowy - TCP. Badane próbki kompozytu ceramicznego HAp + TCP powstały przez zmieszanie 60% HAp i 40% TCP. Uformowane kształtki HAp i HAp + TCP wypalono w temp.  $1250^\circ\text{C}$ .

Uziarnienie obu rodzajów materiałów wynosiło poniżej 0,06 mm. Powierzchnia HAp oraz HAp + TCP miała podobny wygląd. Była nieregularna, miała liczne pory o średnicy od 10 do 100  $\mu\text{m}$ . Struktura implantów miała charakter licznych, połączonych granul o zaokrąglonych brzegach.

Kompozyty dwufazowej ceramiki hydroksyapatytowej z gipsem (HAp + gips) otrzymano poprzez połączenie w odpowiedniej proporcji hydroksyapatytu z półwodnym gipsem ( $\text{CaSO}_4 \times \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ). Materiałem porównawczym był implant wykonany z czystego hydroksyapatytu (HAp) – o wzorze chemicznym  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

Materiały do badań były uformowane w kształcie walców o średnicy 3 mm i wysokości 8 mm. Przed przystąpieniem do badań wszystkie próbki poddano sterylizacji tlenkiem etylenu GS-1 w sterylizatorze gazowym GST- 21 przez 4 h, a następnie wietrzono przez 6 tygodni.

## METODY BADAŃ

### **Badania doświadczalne na zwierzętach**

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 19/02 z dnia 27.02.2002 r.

Operacje przeprowadzono na 24 królikach obojga płci, rasy nowozelandzkiej białej, o masie ciała 3,2-3,5 kg. W zależności od badanego materiału zwierzęta podzielono na 2 grupy po 12 królików w każdej.

Króliki do zabiegu znieczulano w następujący sposób:

**Premedykacja:** Chlorpromazine w dawce 5-10 mg/kg m.c./i.m. (preparat Trankwilina – Biowet-Puławy), Atropinum sulf. w dawce 0,1 mg/kg m.c.s.c. (preparat Atrop.Polfa Poznań).

**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:** Łukowatym cięciem skóry w okolicy 1/3 górnej części prawego uda i po rozdzieleniu, na tępo, mięśnia dwugłowego uda i mięśnia obszernego bocznego, odsłonięto krętarz większy. Po przecięciu okostnej, w krętarzu nawiercano kanał o odpowiedniej głębokości i o średnicy 3 mm i wprowadzano implanty z HAp + TCP lub HAp + gips. Następnie ranę warstwowo zeszyto. Technika wprowadzania implantów z HAp (kontrola) do kości lewego uda była identyczna.

### **Badania makroskopowe**

W badaniach pooperacyjnych oceniano ogólny stan zdrowia zwierząt, przebieg gojenia się ran operacyjnych oraz ruchomość kości udowych królika.

Eutanazje królików przeprowadzono przez podanie Pentobarbitalu w dawce maksymalnej 200 mg/kg m.c., a następnie wykonano dyslokację kręgów szyjnych. Sekcje królików wykonano 5, 9, 11 i 14 tygodni po operacji, przeznaczając po 3 zwierzęta 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.

## **Mikroanaliza pierwiastków**

Kości udowe wraz ze wszczepionymi implantami gotowano w wodzie z dodatkiem ługu sodowego przez 20 minut. Po dokładnym usunięciu wszystkich tkanek miękkich, kości suszono w termostacie w temperaturze 37°C przez 14 dni. Wycinki tkanki kostnej utrwalono w 3% roztworze aldehydu glutarowego, w 0,1M buforze fosforanowym (przez 3 h), a następnie dokonywano utrwalania dodatkowego w 1% roztworze czterotlenku osmu (przez 1 h), w wyżej wymienionym buforze. Tak przygotowany materiał odwodniono w szeregu alkoholowo-acetonowym i następnie suszono.

Fragmenty tkanki kostnej poddano analizie mikroskopowo-elektronowej (SEM) w skaningowym mikroskopie elektronowym Leo-Zeiss 435, wyposażonym w przystawkę „Roentec” do prowadzenia mikroanalizy rentgenowskiej. Do badań w SEM utrwalony i wysuszony materiał napyłano złotem, natomiast do mikroanalizy rentgenowskiej takiego napyłania nie wykonywano. Przeprowadzono analizę punktową występujących w preparatach pierwiastków oraz ich topograficzne rozmieszczenie w próbce (tzw. mapping), w 3 punktach tkanki kostnej: na powierzchni tkanki kostnej otaczającej implant, w tkance kostnej bezpośrednio przylegającej do implantu i w tkance kostnej penetrującej implant.

Zmiany ilościowe i jakościowe pierwiastków biorących udział w odbudowie kości są najbardziej uchwytne w 5, 9, 11 i 14 tygodniu po wszczepieniu materiałów hydroksyapatytowych i dlatego badania tkanki kostnej zaplanowano w wyżej wymienionych terminach [25-28].

## **WYNIKI BADAŃ**

### **Badania pooperacyjne**

Rany operacyjne u wszystkich zwierząt zagoiły się przez rychłozrost. Przez cały czas trwania eksperymentu żadne ze zwierząt nie padło. Króliki wykazywały prawidłowy przyrost wagi, ruchliwość i łaknienie. Operowane kończyny tylne królików miały prawidłowy kształt i zachowały prawidłową ruchomość w stawach biodrowych.

### **Badania makroskopowe**

Obraz makroskopowy miejsc implantacji badanych materiałów, we wszystkich grupach królików i we wszystkich terminach sekcyjnych był podobny.

Mięśnie, będące w bezpośrednim kontakcie z wszczepem, zachowywały prawidłową budowę (wygląd, kolor i ukrwienie). Nie stwierdzono w nich zmian zapalnych. Krętarze większe kości udowych królików miały prawidłowy kształt i wielkość. W 5 tygodniu po operacji, u wszystkich zwierząt stwierdzono pokrycie implantów okostną. Po odpreparowaniu okostnej na ostro, uwidoczniono wszczepy, które ściśle przylegały do kości.

W 9 tygodniu lokalizacja implantów HAp+gips była możliwa tylko za pomocą zdjęć radiologicznych, gdyż wszczepy były ściśle zintegrowane z kością. Pełną integrację implantów HAp i HAp+TCP z kością stwierdzono również w 11 tygodniu po operacji. Narządy wewnętrzne jamy brzusznej i klatki piersiowej zwierząt nie wykazały zmian patologicznych.

## **Mikroanaliza pierwiastków**

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1-3 oraz na rycinach 1-3.

### **Grupa kontrolna Hap**

W 5 tygodniu po wszczepieniu materiału występuje niewielkie odgraniczenie strefy implantu od kości. Przeprowadzona mikroanaliza w strefie penetracji tkanką kostną implantu, wykazuje niepełne wysycenie wapniem (4,18%) oraz fosforem (3,62%). Natomiast mineralizacja tkanki kostnej przylegającej bezpośrednio do implantu jest zasadniczo prawidłowa (Ca - 13,1%, P - 7,62%).

W 9 tygodniu po wszczepieniu ceramiki, obszar penetracji implantu tkanką kostną jest pełniejszy. Wysycenie wapniem wyniosło 11,41%, a fosforem 7,24%. Natomiast mineralizacja tkanki kostnej bezpośrednio przylegającej do implantu jest w niewielkim stopniu wyższa, niż po 5 tygodniach (Ca - 17,70%, P - 10,63%).

W 11 tygodniu następuje dalsza mineralizacja tkanki kostnej penetrującej implant. Natomiast w tkance kostnej bezpośrednio przylegającej do wszczepu stwierdzono istotny spadek poziomu wapnia (Ca - 2,82) i fosforu (P - 1,53).

W 14 tygodniu po wszczepieniu implantu stopień wysycenia zarówno wapniem jak i fosforem jest relatywnie niższy niż po 11 tygodniach. Pomimo, że poziomy pierwiastków są niższe, to stosunek ilościowy wapnia do fosforu pozostaje prawidłowy (ryc. 4).

### **Grupa HAp + TCP**

W 5 tygodniu po wszczepieniu kompozytu stwierdza się podobne odgraniczenie materiału od kości jak w grupach, u których zastosowano HAp (Ryc. 5). Stopień mineralizacji, zarówno tkanki kostnej penetrującej implant jak i bezpośrednio przylegającej do implantu, wykazuje wyższy poziom niż w przypadku HAp. Wskazywać to może na szybciej postępujący proces tworzenia się kostniny niż w grupie z HAp.

W 9 tygodniu po wszczepieniu kompozytu obszar penetracji wykazuje rozwinięty proces osteogenezy. Stopień mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant rozwija się osiągając: Ca – 9,20%, P – 7,52%. Są to poziomy charakteryzujące tkankę kostną w okresie ich progresji rozwojowej, czyli kształtowania nowej tkanki.

W 11 tygodniu po implantacji poziom mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant jest podobny jak po 9 tygodniach.

W 14 tygodniu po wszczepieniu tkanka kostna w strefie penetracji implantu jak i przylegająca do implantu, wykazuje prawidłową strukturę oraz poziomy mineralizacji charakterystyczne dla zdrowej, nie zmienionej kości (ryc. 5).

### **Grupa HAp + gips**

W 5 tygodniu po wszczepieniu kompozytu, w tkance kostnej penetrującej implant oraz w tkance kostnej przylegającej do implantu poziom mineralizacji jest podobny. Są to poziomy w swej istocie zbliżone do tkanki zdrowej (Ca - 12,69, P-7,97).

W 9 i 11 tygodniu po wszczepieniu implantu stopień mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant jest niższy niż po 5 tygodniach. Pomimo, że poziomy pierwiastków są niższe, to stosunek ilościowy wapnia do fosforu pozostaje prawidłowy. Poziomy mineralizacji ulegają dalszemu utrwaleniu w kierunku tkanki zdrowej.

W 14 tygodniu po wszczepieniu implantu, stwierdzono dalszy spadek stopnia mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant, który bardzo upodabnia się do tego jaki obserwowano w 14 tygodniu w przypadku stosowania HAp (Ca - 4,94, P - 3,82). Natomiast stopień mineralizacji tkanki kostnej otaczającej implant, jest wyższy niż w terminach wcześniejszych i w grupach z HAp i HAp+TCP (ryc. 6).

## **OMÓWIENIE WYNIKÓW**

Bioaktywność ceramiki fosforanowo-wapniowej, wyrażająca się jej zdolnością do osteoindukcji i osteokondukcji, zależy od składu chemicznego, stopnia krystaliczności, porowatości i kształtu, które to czynniki wpływają na jej rozpuszczalność oraz zdolności do resorpcji.

Istotą bioaktywności tej ceramiki jest wytworzenie wiązania chemicznego i biologicznego z otaczającymi tkankami. Jest to zjawisko złożone, które rozpoczyna się bezpośrednio po implantacji. Etap pierwszy, będący rezultatem działania enzymów i komórek, to powstanie na powierzchni wszczepu środowiska o odczynie kwaśnym, co w dalszej kolejności powoduje wzajemną wymianę jonową, strukturalną przebudowę warstwy na styku implant-tkanka, a następnie depozycję fazy mineralnej i organicznej, jednak bez ich integracji z powierzchnią ceramiki. W dalszej kolejności następuje adhezja komórek na powierzchni implantu, ich proliferacja i różnicowanie się, oraz powstawanie macierzy pozakomórkowej. Wspomniane zjawiska nie mają jednak charakteru liniowego w czasie, ani też żadne z nich nie wydaje się być bardziej istotne od innych. Efekt bioaktywności jest zatem zjawiskiem złożonym, prowadzącym do



stopniowego wbudowywania aktywnego implantu w nowo powstającą tkankę kostną.

Zachodzące procesy chemiczne mają oczywiście związek ze składem ilościowym i proporcjami pierwiastków w implancie, ale tylko w niewielkim stopniu zależne są od jego struktury fizycznej. Natomiast wytworzenie połączenia biologicznego ceramiki z kością, uzależnione jest od wielkości porów i ich przestrzennego rozmieszczenia. Najbardziej optymalna wielkość porów w ceramice, pozwalająca na przerośnięcie tkanką kostną powinna wynosić od 100 do 300  $\mu\text{m}$  [4]. Uwolnione w czasie resorpcji jony wapnia i fosforu biorą udział w procesie osteogenezy.

Przykładem materiału o niewielkim stopniu biodegradacji jest HAp, którego resorpcja w organizmie wynosi od 5 do 15 % w ciągu roku. Całkowite połączenie implantu HAp z kością trwa około roku [4, 5, 9, 21]. W celu poprawy własności resorpcyjnych wszczepów, przygotowano kompozyty, w skład których wchodziły oprócz HAp:  $\beta$  fosforan trójwapniowy (TCP) lub uwodniony siarczan wapnia (gips). Biodegradacja TCP, według różnych autorów, wynosi po 3 miesiącach od 15 do 30 %. Gips jest tworzywem, które najłatwiej się rozpuszcza i najszybciej ulega resorpcji. Całkowita resorpcja siarczanu wapnia, według różnych autorów, następuje około 13 tygodnia [4, 9, 21, 24].

Wykonana analiza punktowa pierwiastków oraz ich topograficzne rozmieszczenie (mapping) w kościach po implantacji HAp, oraz kompozytów HAp + TCP i HAp + gips, wykazała dość istotne różnice między badanymi wszczepami. Różnice te były najbardziej istotne w 5 i 14 tygodniu i zależały od stopnia resorpcji badanych materiałów.

Mineralizacja tkanki kostnej penetrującej implant, w 5 tygodniu była najniższa w grupie ze słabo ulegającemu biodegradacji HAp. Natomiast w kompozytach zawierających resorbowalne TCP i uwodniony siarczan wapnia, zawartość wapnia była trzy- i czterokrotnie wyższa. Mineralizacja tkanki kostnej penetrującej implant, dla grupy z HAp+gips, była zbliżona do tkanki zdrowej.

W 9 i 11 tygodniu po implantacji stopień mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant, we wszystkich grupach był na podobnym poziomie. W grupie z HAp nastąpił wzrost zawartości wapnia i fosforu w porównaniu do wyników po 5 tygodniach. Wzrost ten był, prawdopodobnie, związany z przerastaniem tkanką kostną implantu. Natomiast w grupach z kompozytami zawierającymi TCP i siarczan wapnia nastąpił spadek mineralizacji, co może świadczyć o resorpcji tych tworzyw. Zawartość wapnia i fosforu w tych grupach była porównywalna.

W 14 tygodniu w tkance penetrującej implant z HAp i HAp+gips, stopień wysycenia zarówno wapniem jak i fosforem, jest relatywnie niższy niż po 11 tygodniach. Stosunek wapnia do fosforu był prawidłowy. Spadek mineralizacji tkanki kostnej może wynikać z rozpoczętego procesu przebudowy i modelowania wytworzonej tkanki kostnej. Zazwyczaj taki proces rozpoczyna

się od ogniska osteoresorpcji, a dopiero w następnym etapie dochodzi do tworzenia nowych blaszek kostnych i kolejnych generacji osteonów. W przypadku tkanki kostnej z HAp+gips, spadek wysycenia wapniem i fosforem może być również spowodowany całkowitą resorpcją siarczanu wapnia.

Stopień mineralizacji tkanki kostnej penetrującej wszczep z HAp+TCP, był wyższy niż w przypadku HAp i HAp+gips oraz w stosunku do terminów wcześniejszych, co jest związane z prawidłowym przerastaniem implantu tkanką kostną.

Stopień mineralizacji tkanki kostnej, bezpośrednio przylegającej do implantu, w grupie z HAp+gips charakteryzował się stopniowym wzrostem, co może świadczyć o jego osteoindukcyjnym działaniu. W grupach z HAp i HAp+TCP, stopień wysycenia wapniem i fosforem tkanki kostnej otaczającej implant, w miarę upływu czasu spadał i w 14 tygodniu była dla grupy z HAp trzykrotnie niższy, a dla grupy z HAp+TCP dwukrotnie niższy niż dla grupy z HAp+gips.

Implantowane do kości królików kompozyty hydroksyapatytowe HAp + TCP i HAp + gips, w których TCP i gips należą do materiałów resorbujących się, dostarczyły jony Ca i P do odbudowy kości w miejscu jej ubytku. Jednak powolna resorpcja TCP wydaje się być bardziej korzystna od szybkiej resorpcji gipsu. Szybkość odtwarzania nowej kości w przypadku wszczepów HAp+gips nie jest proporcjonalna do tempa ich resorpcji (4, 9). Stopień mineralizacji tkanki kostnej penetrującej implant wokół wszczepów z HAp+TCP wzrastał stopniowo, osiągając w 14 tygodniu poziomy charakterystyczne dla zdrowej kości. Natomiast w przypadku HAp+gips mineralizacja tkanki kostnej penetrującej wszczep przebiegała w kierunku odwrotnym, osiągając w 14 tygodniu wartości najniższe. W przypadku wszczepów zawierających siarczan wapnia odbudowa nowej tkanki kostnej następowała zdecydowanie wolniej niż resorpcja implantu, co może doprowadzić do jego obluzowania.

## **WNIOSKI**

1. Najwyższy stopień mineralizacji tkanki kostnej otaczającej wszczep, stwierdzono w miejscu wszczepu HAp+ gips w porównaniu do HAp i HAp+TCP
2. Spośród przebadanych materiałów najlepsze właściwości osteokondukcyjne ma kompozyt hydroksyapatytu z TCP, a osteoindukcyjne kompozyt hydroksyapatytu z gipsem.

**Praca została wykonana w ramach badań własnych Uczelni  
- nr projektu 371**

## LITERATURA

- [1]. Chase S.N., Herndon C.H.: The fate of autogenous and homogenous bone grafts: A historical review. *J. Bone Jt. Surg.* (1975), 37A, 809.
- [2]. Perry J.D., Goldberg R.A., McCann J.D., Shorr N., Engstrom R., Tong J.: Bovine hydroxyapatite orbital implant: a preliminary report. *Ophthal. Plast. Reconstr. Surg.* (2002), Jul., 18, (4), 268-274.
- [3]. Pratt J.N., Griffon D.J., Dunlop D.G., Smith N., Howie C.R.: Impaction grafting with morsellised allograft and tricalcium phosphate-hydroxyapatite: incorporation within ovine metaphyseal bone defects. *Biomaterials.* (2002), Aug., 23, (16), 3309-3317.
- [4]. Vaccaro A.R.: The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* (2002), 25, 5, 571-578.
- [5]. Cao W., Hench L.: Bioactive materials. *Ceramics International.* (1996) 22, 493-507.
- [6]. Mahjubala I., Sivakumur M., Sureshkumar R.V., Sastry T.P.: Bioactivity and osseointegration study of calcium phosphate ceramic of different chemical composition. *J. Biomed Mater. Res.*, (2002), 63, (2), 200-208.
- [7]. Neo M., Voigt C.F., Herbst H., Gross U.M.: Analysis of osteoblast activity at biomaterial- bone interfaces by in situ hybridization. *J. Biomed. Mater. Res.* (1996), 30, 485-492.
- [8]. Pielka S., Paluch D., Staniszevska- Kuś J., Solski L.: Badania biogodności materiałów implantacyjnych. *Biomateriały pod red. Błażewicz S., Stoch L. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa* (2003), Rozdz.6, 425-482.
- [9]. Ślósarczyk A.: Bioceramika oparta o fosforany wapnia; w *Biomateriały pod red. Błażewicz S., Stoch L., Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa* (2003), 99-205.
- [10]. Aoki H.: Medical applications hydroxyapatite. *Ishiyaku EuroAmerica, Inc., Tokyo, St. Louis* (1994), 56-68.
- [11]. Becker W., Becker B. E., Berg L.: Repair of infrabony defects as a result of open debridement procedures. Report of 36 treated cases. *Inter. Periodontal Restorative Dentistry.* (1986), 6, 8-21
- [12]. Graves E.: Vital and health statistics, detailed diagnoses and procedures, national hospital discharge survey, 1993. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. (1995), 21-29.
- [13]. Herzwurm P. J., Simpson S. L., Duffin S., Oswald S.G., Ebert F. R.: Thigh pain and total hip arthroplasty. *Clin. Ortop.* (1997), 336, 156-161.
- [14]. Jackson T., Yaruzer R.: Hydroxyapatite cement an alternative for craniofacial skeletal contour refinements. *Br. J. Plast. Surg.* (2000), 53, 24-29.

- [15]. Tsuang Y.H., Lin F.H., Tai H.C., Sun J.S., Liu H.C., Hang Y.S.: Biocompatibility and osteoconductivity of the pyrost bone substitutes. *Histol-Histopathol.* (1997), Jan., 12, (1), 19-24.
- [16]. Tada H., Hatoko M., Tanaka A., Kuwahara M., Mashiba K., Yurugi S., Iioka H., Niitsuma K.: Preshaped hydroxyapatite tricalcium-phosphate implant using three-dimensional computed tomography in the reconstruction of bone deformities of craniomaxillofacial region. *Craniofac. Surg.* (2002), Mar., 13, (2), 287-292.
- [17]. Verheggen R., Merten H.A.: Correction of Skull Defects Using Hydroxyapatite Cement (HAC)- Evidence Derived from Animal Experiments and Clinical Experience. *Acta Neurochir.(Wien).* (2001), 143, 919-926.
- [18]. Wang J., Chen W., Li Y., Fan S., Weng J., Zhang X.: Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae. *Biomaterials.* (1998), Aug., 19, (15), 1387-1392.
- [19]. Kikuchi M., Tanaka J., Koyama Y., Takakuda K.: Cell culture test of TCP/CPLA composite. *J. Biomed. Mater. Res.* (1999), 48, (2), 108-110.
- [20]. De Bruijn J.D., Bovell Y.P., van Blitterswijk C.A.: Osteoblast and osteoclast responses to calcium phosphates. Anderson, Happonen, Yli - Urpo, editors. *Bioceramics 7.* Butterworth - Heinemann Ltd., (1994), 293-298.
- [21]. Ducheyne P., Q.: Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* (1999), 20, 2287-2303.
- [22]. Peltier L. F.: The use of "plaster of Paris" to fill defects in bone. *Clin. Orthop.* (1961), 21, 1-31.
- [23]. Damien C.J., Parsons J.R., Benedict J.J., Weisman D.S.: Investigation of hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J. Biomed. Mat. Res.* (1990), 639-654.
- [24]. Turner T.M., Urban R. M., Gitelis S., Haggrd W. O., Richelsoph K.: resorption evaluation of a large bolus of calcium sulfate in a canine medullary defect. *Orthopedics* (2003), 26, 577-579.
- [25]. Będziński R., Kuryszko J., Gawin E., Kuropka P.: Bone remodeling load concentration zones. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, (2000), 2, Suppl. 1, 80-84.
- [26]. Kuryszko J., Zarzycki J.: *Histologia zwierząt.* Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne (2000).
- [27]. Kuryszko J., Kuropka P., Jędrzejowska I.: Distraction osteogenesis and fracture healing. Differences and similarities. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, (2000), 2, 3, 4, 227-230.
- [28]. Gomez S., Rizzo R., Pozzi-Mucelli M., Bonucci E., Vittur F.: Zinc Mapping in Bone Tissues by Histochemistry and Synchrotron Radiation-Induced X-Ray Emission: Correlation with the distribution of alkaline phosphatase. *Bone Vol.*, (1999), 25, 1, 33-38.

Adres autorów:

Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów  
Akademii Medycznej we Wrocławiu  
ul. Poniatowskiego 2, 50-326 Wrocławiu  
e-mail: [biomat@cheksp.am.wroc.pl](mailto:biomat@cheksp.am.wroc.pl)

**Opis rycin:**

Ryc. 1. Stopień wysycenia pierwiastkami wapnia i fosforu tkanki kostnej otaczającej wszczep

Fig.1. The saturation level of Ca and P of the bone tissue surrounded the implant.

Ryc. 2. Stopień wysycenia pierwiastkami wapnia i fosforu tkanki kostnej penetrującej wszczep.

Fig 2. The saturation level of Ca and P of the bone tissue which penetrated into the implant

Ryc. 3. Stopień wysycenia pierwiastkami wapnia i fosforu tkanki kostnej bezpośrednio przylegającej do wszczepu

Fig 3. The saturation level of Ca and P of the bone tissue which adhered directly to the implants

Ryc. 4. Mikroanaliza rentgenowska szlifu kostnego 14 tygodni po implantacji HAp do kości królika

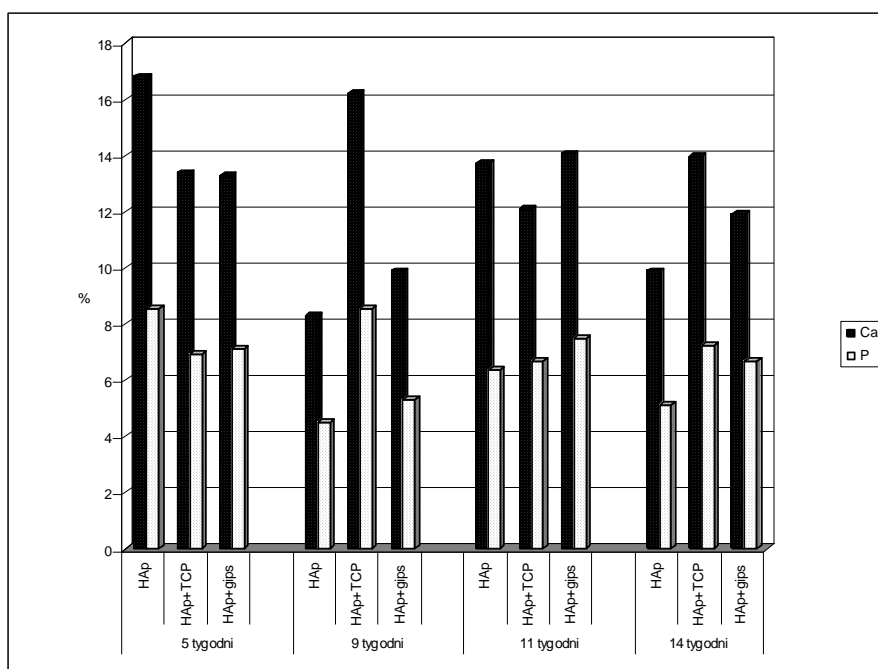
Fig. 4. X-ray microanalysis of osseous microsection 14 weeks after implantation of preparation HAp into bone of a rabbit

Ryc. 5. Mikroanaliza rentgenowska szlifu kostnego 14 tygodni po implantacji HAp+TCP do kości królika

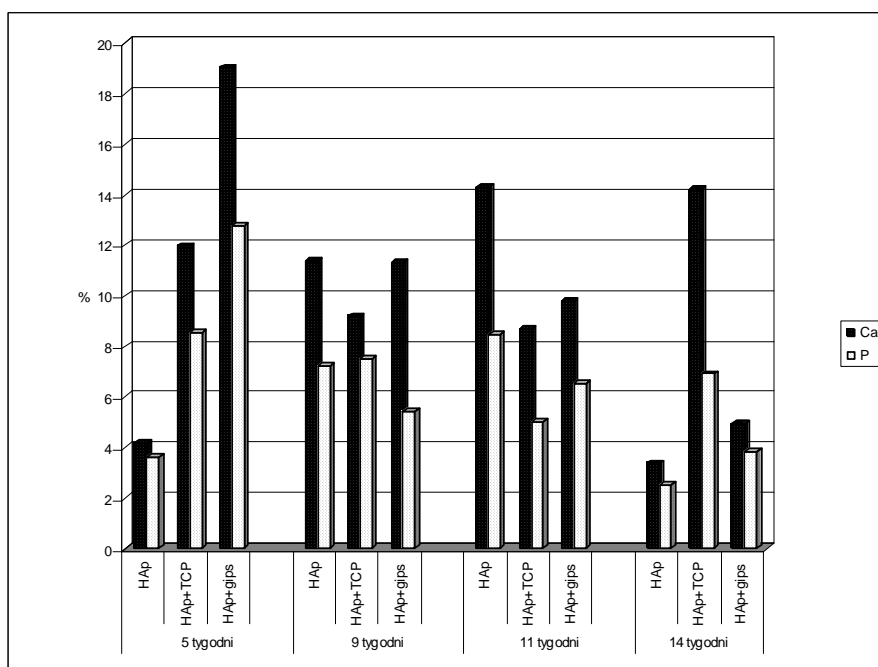
Fig. 5. X-ray microanalysis of osseous microsection 14 weeks after implantation of preparation HAp+TCP into bone of a rabbit

Ryc. 6. Mikroanaliza rentgenowska szlifu kostnego 14 tygodni po implantacji HAp+gips do kości królika

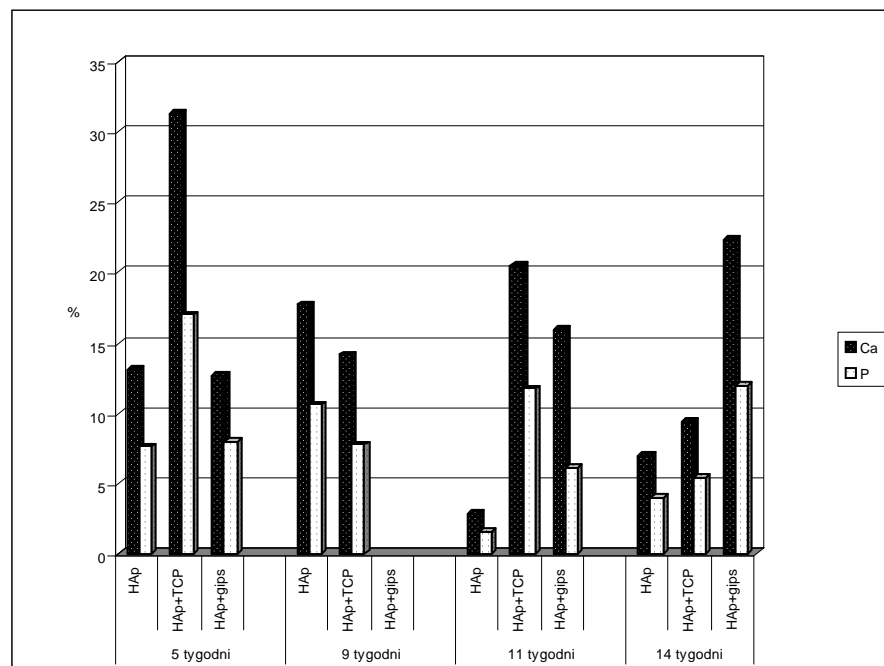
Fig. 6. X-ray microanalysis of osseous microsection 14 weeks after implantation of preparation HAp+gypsum into bone of a rabbit



Ryc. 1



Ryc. 2



Ryc. 3.



Tabela 1. Punktowa analiza pierwiastków w tkance kostnej po implantacji HAp  
Table 1. Punctual analysis of elements in bone tissue after implantation of HAp

| Tygodnie | Miejsce<br>oceny | Pierwiastki / % |                |                |                |               |               |               |
|----------|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|          |                  | C               | O              | Ca             | P              | Na            | Mg            | Inne          |
| 5        | powierzchnia     | 35,50<br>±2,95  | 38,69<br>±3,56 | 16,83<br>±0,75 | 8,55<br>±0,42  | 0,28<br>±0,10 | 0,15<br>±0,08 | -             |
|          | punkt I          | 50,05<br>±8,07  | 40,32<br>±6,63 | 4,18<br>±0,22  | 3,62<br>±0,16  | 1,26<br>±0,10 | 0,57<br>±0,07 | -             |
|          | punkt II         | 38,17<br>±6,83  | 40,14<br>±7,25 | 13,10<br>±0,58 | 7,62<br>±0,33  | 0,72<br>±0,11 | 0,24<br>±0,07 | -             |
| 9        | powierzchnia     | 47,05<br>±7,91  | 38,13<br>±6,68 | 8,31<br>±0,39  | 4,53<br>±0,22  | 0,11<br>±0,10 | 1,87<br>±0,13 | -             |
|          | punkt I          | 47,21<br>±7,99  | 34,14<br>±6,05 | 11,41<br>±0,52 | 7,24<br>±0,37  | -             | -             | -             |
|          | punkt II         | 28,86<br>±2,45  | 41,83<br>±3,72 | 17,70<br>±0,77 | 10,63<br>±0,46 | 0,70<br>±0,12 | 0,29<br>±0,08 | -             |
| 11       | powierzchnia     | 44,01<br>±8,12  | 34,69<br>±6,83 | 13,76<br>±0,67 | 6,40<br>±0,34  | 0,11<br>±0,11 | 0,04<br>±0,06 | 0,99<br>±0,11 |
|          | punkt I          | 36,19<br>±6,62  | 40,69<br>±7,39 | 14,30<br>±0,66 | 8,48<br>±0,38  | -             | -             | 0,34<br>±0,11 |
|          | punkt II         | 57,54<br>±8,93  | 37,88<br>±6,01 | 2,82<br>±0,15  | 1,53<br>±0,08  | -             | -             | 0,23<br>±0,05 |
| 14       | powierzchnia     | 45,30<br>±7,63  | 39,47<br>±6,78 | 9,90<br>±0,44  | 5,13<br>±0,24  | 0,17<br>±0,10 | 0,03<br>±0,05 | -             |
|          | punkt I          | 53,45<br>±8,64  | 39,08<br>±6,50 | 3,38<br>±0,21  | 2,52<br>±0,14  | 1,10<br>±0,12 | 0,40<br>±0,07 | 0,07<br>±0,06 |
|          | punkt II         | 53,16<br>±8,57  | 35,91<br>±6,01 | 6,95<br>±0,37  | 3,97<br>±0,21  | -             | -             | -             |

Powierzchnia - tkanka kostna otaczająca implant / bone tissue surrounded implant;

Punkt I - tkanka kostna penetrująca implant / bone tissue penetrated into implant;

Punkt II - tkanka kostna bezpośrednio przylegająca do implantu / bone tissue adhered directly to implant.

Tabela 2. Punktowa analiza pierwiastków w tkance kostnej po implantacji HAp+TCP  
Table 2. Punctual analysis of elements in bone tissue after implantation of HAp+TCP

| Tygodnie | Miejsce oceny | Pierwiastki / % |                |                       |                       |               |               |               |
|----------|---------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
|          |               | C               | O              | Ca                    | P                     | Na            | Mg            | Inne          |
| 5        | powierzchnia  | 39,14<br>±8,09  | 40,26<br>±8,37 | <b>13,40</b><br>±1,30 | <b>6,93</b><br>±0,63  | 0,23<br>±0,17 | 0,03<br>±0,09 | -             |
|          | punkt I       | 25,52<br>±5,20  | 50,97<br>±9,05 | <b>11,98</b><br>±0,62 | <b>8,56</b><br>±0,42  | 1,99<br>±0,19 | 0,98<br>±0,12 | -             |
|          | punkt II      | 10,04<br>±0,99  | 40,55<br>±3,70 | <b>31,31</b><br>±2,87 | <b>16,98</b><br>±1,06 | 0,77<br>±0,22 | 0,35<br>±0,16 | -             |
| 9        | powierzchnia  | 32,42<br>±2,71  | 40,38<br>±3,58 | <b>16,26</b><br>±0,80 | <b>8,54</b><br>±0,41  | 0,52<br>±0,12 | 0,12<br>0,09  | 1,87<br>±0,99 |
|          | punkt I       | 44,01<br>±7,52  | 37,84<br>±6,62 | <b>9,20</b><br>±0,44  | <b>7,52</b><br>±0,33  | 1,43<br>±0,13 | -             | -             |
|          | punkt II      | 46,87<br>±8,04  | 30,16<br>±5,55 | <b>14,15</b><br>±0,57 | <b>7,78</b><br>±0,31  | 1,04<br>±0,12 | -             | -             |
| 11       | powierzchnia  | 41,71<br>±7,43  | 38,74<br>±7,01 | <b>12,11</b><br>±0,58 | <b>6,69</b><br>±0,32  | 0,48<br>±0,11 | 0,09<br>±0,09 | 0,19<br>±0,07 |
|          | punkt I       | 47,83<br>±8,01  | 38,13<br>±6,59 | <b>8,67</b><br>±0,41  | <b>5,0</b><br>±0,25   | -             | -             | 0,36<br>±0,08 |
|          | punkt II      | 31,52<br>±2,68  | 35,01<br>±3,30 | <b>20,50</b><br>±0,95 | <b>11,75</b><br>±0,55 | 0,67<br>±0,12 | 0,23<br>±0,09 | 0,33<br>±0,10 |
| 14       | powierzchnia  | 43,87<br>±7,71  | 34,64<br>±6,44 | <b>14,00</b><br>±0,65 | <b>7,23</b><br>±0,33  | -             | 0,05<br>±0,06 | 0,20<br>±0,08 |
|          | punkt I       | 44,47<br>±7,70  | 33,24<br>±6,12 | <b>14,24</b><br>±0,62 | <b>6,91</b><br>±0,30  | -             | 1,14<br>±0,10 | -             |
|          | punkt II      | 53,68<br>±8,75  | 31,11<br>±5,39 | <b>9,39</b><br>±0,38  | <b>5,40</b><br>±0,22  | 0,42<br>±0,09 | -             | -             |

Powierzchnia - tkanka kostna otaczająca implant / bone tissue surrounded implant;

Punkt I - tkanka kostna penetrująca implant / bone tissue penetrated into implant;

Punkt II - tkanka kostna bezpośrednio przylegająca do implantu / bone tissue adhered directly to implant.

Tabela 3. Punktowa analiza pierwiastków w tkance kostnej po implantacji HAp+gips  
Table 3. Punctual analysis of elements in bone tissue after implantation of HAp+gypsum

| Tygodnie | Miejsce oceny | Pierwiastki / % |                |                       |                       |               |               |               |
|----------|---------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
|          |               | C               | O              | Ca                    | P                     | Na            | Mg            | Inne          |
| 5        | powierzchnia  | 30,80<br>±6,18  | 46,80<br>±8,61 | <b>13,33</b><br>±0,71 | <b>7,13</b><br>±0,36  | 0,66<br>±0,12 | 0,25<br>±0,08 | 1,03<br>±     |
|          | punkt I       | 8,43<br>±0,84   | 57,37<br>±4,87 | <b>19,05</b><br>±0,85 | <b>12,78</b><br>±0,58 | 1,49<br>±0,17 | 0,88<br>±0,11 | -             |
|          | punkt II      | 31,29<br>±5,93  | 45,75<br>±8,11 | <b>12,69</b><br>±0,54 | <b>7,97</b><br>±0,38  | 1,42<br>±0,13 | 0,68<br>±0,08 | 0,21<br>±0,06 |
| 9        | powierzchnia  | 46,63<br>±7,91  | 38,02<br>±6,64 | <b>9,90</b><br>±0,53  | <b>5,30</b><br>±0,30  | -             | -             | 0,14<br>±0,07 |
|          | punkt I       | 57,47<br>±9,45  | 25,78<br>±4,79 | <b>11,31</b><br>±0,54 | <b>5,44</b><br>±0,27  | -             | -             | -             |
|          | punkt II      | n.b.            | n.b.           | n.b.                  | n.b.                  | n.b.          | n.b.          |               |
| 11       | powierzchnia  | 36,97<br>±6,84  | 40,79<br>±7,52 | <b>14,08</b><br>±0,70 | <b>7,52</b><br>±0,36  | 0,39<br>±0,13 | 0,25<br>±0,08 | -             |
|          | punkt I       | 42,33<br>±7,37  | 40,17<br>±7,07 | <b>9,81</b><br>±0,48  | <b>6,54</b><br>±0,30  | 0,85<br>±0,13 | 0,30<br>±0,09 | -             |
|          | punkt II      | 40,51<br>±7,33  | 37,02<br>±6,91 | <b>15,90</b><br>±0,74 | <b>6,11</b><br>±0,32  | 0,43<br>±0,11 | 0,04<br>±0,06 | -             |
| 14       | powierzchnia  | 42,95<br>±7,66  | 37,35<br>±6,84 | <b>11,94</b><br>±0,64 | <b>6,68</b><br>±0,37  | 0,71<br>±0,13 | 0,37<br>±0,08 | -             |
|          | punkt I       | 54,99<br>±8,91  | 35,20<br>±5,97 | <b>4,94</b><br>±0,27  | <b>3,82</b><br>±0,20  | 0,69<br>±0,11 | 0,37<br>±0,07 | -             |
|          | punkt II      | 17,17<br>±1,53  | 45,99<br>±4,07 | <b>22,36</b><br>±0,94 | <b>11,98</b><br>±0,72 | 0,93<br>±0,19 | 0,46<br>±0,11 | 1,12<br>±0,24 |

Powierzchnia - tkanka kostna otaczająca implant / bone tissue surrounded implant;

Punkt I - tkanka kostna penetrująca implant / bone tissue penetrated into implant;

Punkt II - tkanka kostna bezpośrednio przylegająca do implantu / bone tissue adhered directly to implant.