

---

***PRACE***

---

**Instytutu Szkła, Ceramiki  
Materiałów Ogniotrwałych  
i Budowlanych**

---

***Scientific Works***  
of Institute of Glass, Ceramics  
Refractory and Construction Materials

---

**Nr 1**

ISSN 1899-3230

**Rok I**

**Warszawa–Opole 2008**

---

*JOANNA KARAS<sup>\*\*</sup>*  
*STANISŁAW PIELKA<sup>\*\*</sup>*  
*DANUTA PALUCH<sup>\*\*\*</sup>*  
*LIDIA CIOŁEK<sup>\*\*\*\*</sup>*

# Ocena właściwości fizykochemicznych i cytotoksyczności opracowanych cementów wapniowofosforanowych do wypełnienia ubytków kostnych w zastosowaniach medycznych

Badania przeprowadzono pod kątem oceny właściwości fizykochemicznych, biogodności i cytotoksyczności cementów wapniowofosforanowych do iniekcyjnego wypełniania ubytków kości w zastosowaniach medycznych. Wszystkie otrzymane cementy zostały porównane w niektórych zakresach: czasu wiązania, wytrzymałości na ściskanie, zarabialności, podatności na iniekcję i integralności w środowisku symulującym płyn fizjologiczny (SBF). Oceniono cytotoksyczność cementów w bezpośrednim kontakcie z niektórymi fibroblastami mysimi 3T3 Balb/C, przy czym udowodniono, że można poprawić ich właściwości przez modyfikację składów i otrzymać iniekcyjne, biogodne cementy odpowiednie do zastosowań klinicznych.

## 1. Wprowadzenie

Współczesna chirurgia kostna korzysta w codziennej praktyce z biomateriałów określanych jako cement [9]. Cementy stosowane są do mocowania endoprotez stawów w ortopedii, wypełnień ubytków kostnych powstających w wyniku urazów i chorób układu kostnego, takich jak reumatyzm i osteoporoza, oraz

---

\* Mgr inż., Instytut Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych, Zakład Bioceramiki, Warszawa.

\*\* Prof. dr hab. n. med., Akademia Medyczna, Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, Wrocław.

\*\*\* Dr n. przyr., Akademia Medyczna, Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów, Wrocław.

\*\*\*\* Mgr inż., Instytut Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych, Zakład Bioceramiki, Warszawa.

w przypadku tworzenia się cyst i nowotworów. Rolę cementów w chirurgii kostnej można sprowadzić do dwóch zasadniczych zastosowań:

- mocowania endoprotez stawów;
- ścisłego wypełniania przestrzeni ubytków kostnych.

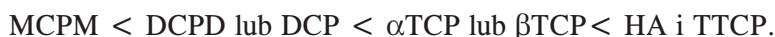
Współcześnie szeroko stosowane cementy kostne wytwarzane na bazie polimetakrylanu metylu (PMMA) posiadają istotne zalety, jak: szybki czas wiązania, dużą wytrzymałość na ściskanie i nierozmywalność przez krew; ale obok zalet występuje jednak wiele udokumentowanych wad, jak reakcja egzotermiczna wiązania, podczas której dochodzi do znaczącego lokalnego wzrostu temperatury powodującego nekrozę komórek, skłonność do depolimeryzacji, kruchość oraz konieczność wykonywania reoperacji z powodu obłuzowania się endoprotezy. Cementy PMMA, choć uważane za biogodne, po wszczepieniu wywołują stany zapalne. W tej sytuacji wciąż prowadzi się badania, by poprawić ich właściwości, ale równocześnie poszukuje się możliwości zastąpienia używanych cementów innymi, przynajmniej w niektórych zastosowaniach klinicznych.

W ostatnich latach przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków na świecie są cementy wapniowofosforanowe i wiele z nich ostatnio wprowadzono na rynek. Jednakże cementy te nie mogą być stosowane w miejscach narażonych na duże obciążenia, chociaż czynione są starania o poprawę ich właściwości mechanicznych. Jednocześnie pojawiło się zapotrzebowanie na cementy, które mogłyby być aplikowane iniekcyjnie podczas zabiegów mało inwazyjnych, jak niektóre zabiegi w chirurgii kregostupa czy kolana [1].

Cementy wapniowofosforanowe są otrzymywane z proszków, będących mieszaniną fosforanów wapnia, aktywowanych wodą lub wodnymi roztworami nieorganicznych lub organicznych soli. Wiązanie zachodzi poprzez rozpuszczanie jednych fosforanów i strącanie innych. Cementy wapniowofosforanowe są nie tylko biogodne, ale i bioaktywne, resorbowalne *in vivo* i zastępowane stopniowo przez nowotworzoną tkankę kostną. Szybkość resorpcji cementów wapniowofosforanowych zależy od ich składu, bowiem fosforany wapnia można uszeregować według malejącej rozpuszczalności:



Natomiast hydroksyapatyt jest najbardziej stabilnym fosforanem wapnia w środowiskach lekko kwasowych, lekko zasadowych czy też obojętnych. Zasadowość fosforanów wapnia wzrasta w kolejności:



Stosowanie cementów wapniowofosforanowych – w porównaniu z blokami czy granulami z syntetycznego hydroksyapatytu – daje dużą korzyść: mogą być aplikowane w stanie plastycznym *in situ*, co umożliwia optymalne, szczelne wypełnienia ubytków o nieregularnych kształtach.

Aby cement mógł być stosowany klinicznie, powinien spełniać takie wymagania, jak: wykazywać biogodność, charakteryzować się odpowiednim czasem wiązania i stosunkowo szybkim wzrostem wytrzymałości po aplikacji, stabilnością w środowisku fizjologicznym oraz podatnością na iniekcję. Optymalny układ powstaje wówczas, gdy cementy wykazują działanie osteokondukcyjne, czyli umożliwiają osteoindukcyjne wrastanie tkanki kostnej, tzn. pobudzają tworzenie kości poprzez dostarczanie substancji kościotwórczych, oraz działają osteogennie – zapewniają integralność struktury. I dlatego też prowadzone prace (w ramach realizowanego w latach 2004–2007 projektu badawczego nr 4 T 08D 024 25 pt. „Ceramiczne cementy kostne”) ukierunkowane były na opracowanie cementów spełniających te wymagania.

Niniejsza publikacja przedstawia wyniki badań fizykochemicznych opracowanych cementów, oraz ich cytotoksycznego oddziaływania na fibroblasty mysie. W ramach projektu, oprócz Instytutu, również w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym przeprowadzono badania *in vitro* nad opracowanymi cementami w kontakcie z osteoblastami izolowanymi z tkanki ludzkiej, a w Akademii Medycznej we Wrocławiu badania *in vivo* implantacji cementów do tkanki kostnej królików. Wyniki tych badań są przedmiotem odrębnych publikacji.

## 2. Materiały

Badaniami objęto optymalizację warunków syntezy w fazie stałej w procesach wysokotemperaturowych polimorficznych odmian ortofosforanu wapnia ( $\alpha$ TCP i  $\beta$ TCP) oraz fosforanu tlenku wapnia (TTCP) i skład fazowy produktów syntezy. Odpowiednie produkty syntezy, oraz takie jak MCPM i/lub DCP i/lub DCPD wytworzone w wyniku strącania z roztworów, wykorzystano do przygotowania komponentów proszkowych cementów. Komponenty przygotowano więc z różnych fosforanów i o różnym udziale wagowym, a w konsekwencji o różnym stosunku molowym Ca/P. Tabela 1 przedstawia wzory chemiczne i oznaczenia skrótowe oraz nazwy zastosowanych fosforanów wapnia.

Jako płyny do aktywacji komponentów proszkowych stosowano wodę lub roztwory wodne soli nieorganicznych albo kwasów organicznych pochodzenia naturalnego lub ich soli.

Spośród wielu opracowanych cementów w niniejszej publikacji prezentowane są badania sześciu cementów, które w pierwszym etapie badań uznano za spełniające ustalone kryteria przydatności, biorąc pod uwagę ich czasy wiązania i osiągnięte wytrzymałości na ściskanie. Jednak w dalszych badaniach – jak podatności na aplikację iniekcyjną czy integralności struktury cementów w kontakcie z płynem fizjologicznym przed związaniem – dla czterech spośród nich nie uzyskano satysfakcjonujących wyników. Stąd też podjęto starania o modyfikacje ich składu poprzez wprowadzenie dodatków poprawiających takie cechy, jak

T a b e l a 1

*Fosforany wapnia – składniki komponentów proszkowych opracowywanych cementów*

Oznaczenie skrótowe	Nazwa	Wzór chemiczny	Obszar stosowania
MCPM	Dwuwodorofosforan wapnia monohydrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Zastosowany w niewielkich udziałach wagowych w nielicznych cementach
DCPD	Wodorofosforan wapnia dihydrat	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Składnik wielu próbnych cementów
DCP	Wodorofosforan wapnia	$\text{CaHPO}_4$	Składnik wielu próbnych cementów, jak i stosowany do otrzymywania $\alpha\text{TCP}$ , $\beta\text{TCP}$ i TTCP
$\alpha\text{TCP}$	Wysokotemperaturowa odmiana polimorficzna ortofosforanu wapnia	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Zasadniczy składnik większości próbnych cementów
$\beta\text{TCP}$	Niskotemperaturowa odmiana polimorficzna ortofosforanu wapnia	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Składnik kilku próbnych cementów
TTCP	Fosforan tlenku wapnia	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	Zasadniczy składnik kilku próbnych cementów
HA	Hydroksyapatyt	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	Zastosowany w niewielkich udziałach wagowych jako nukleator krystalizacji

zarabialność, podatność na iniekcję i kohezję [3,5–7,11]. W ramach realizacji projektu przeprowadzono badania w szerokim zakresie, stosując wiele różnych substancji i modyfikując składy tych cementów. Cel osiągnięto poprzez zmianę płynu wiążącego, jak to miało w przypadku cementów C i J/I czy wprowadzenie dodatku alginianu sodu do komponentu proszkowego, jak w przypadku cementu K i I. W tabeli 2 przedstawiono składy opracowanych cementów B i H oraz K, I, C, J/I przed i po modyfikacji.

T a b e l a 2

*Składy badanych cementów wapniowofosforanowych*

Symbol cementu	Proszek [% wag.]							Płyn
	$\alpha\text{TCP}$	$\beta\text{TCP}$	DCP	DCPD	HA	$\text{CaCO}_3$	alginian sodu	
B	90,1	–	6,6	3,3	–	–	–	Roztwór bursztynianu sodu – 12% wag.
H	98,0	–	–	–	2,0	–	–	Roztwór $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ – 3% wag.
K	78,0	17,0	–	5,0	–	–	–	Roztwór bursztynianu sodu – 12% wag.

cd. tab. 2

Symbol cementu	Proszek [% wag.]							Płyn
	$\alpha$ TCP	$\beta$ TCP	DCP	DCPD	HA	CaCO <sub>3</sub>	alginian sodu	
K-0,25 alg.	77,80	16,96	-	4,99	-	-	0,25	Roztwór bursztynianu sodu – 12% wag.
I	90,01	-	3,33	3,33	-	3,33	-	Roztwór bursztynianu sodu – 12% wag.
I-1,0 alg.	89,1	-	3,3	3,3	-	3,3	1,0	Roztwór bursztynianu sodu – 12% wag.
C-w	90,0	-	-	10,0	-	-	-	Woda destylowana
C-0,1 gl.	90,0	-	-	10,0	-	-	-	Roztwór gliceryny – 0,1% wag.
J/I	56,8	-	39,9	-	-	3,3	-	Woda destylowana
J/I - 2,5dek.	56,8	-	39,9	-	-	3,3	-	Roztwór dekstranu sodu – 2,5% wag.

### 3. Metody badawcze

#### 3.1. Oznaczanie czasu wiązania cementów

Końcowy czas wiązania oznaczano techniką igłową w temperaturze 37°C, tak jak dla cementów stomatologicznych [8].

#### 3.2. Oznaczanie wytrzymałości na ściskanie opracowanych cementów

Wytrzymałość na ściskanie oznaczano sposobem jak dla cementów stomatologicznych [8]. Dla każdego cementu przygotowano po sześć próbek w kształcie walców o średnicy 4 mm i wysokości 6 mm. Po związaniu cementy były przetrzymywane w roztworze Ringera. Po upływie 24 h próbki cementów poddano ścisaniu, aż do zniszczenia, przy użyciu uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej (Lloyd LR 10K) z szybkością posuwu głowicy 0,7mm/min.

Wytrzymałość na ściskanie,  $C$ , w megapaskalach, obliczono stosując równanie (1):

$$C = \frac{4P}{\pi d^2}, \quad (1)$$

gdzie:

$P$  – maksymalna przyłożona siła [N];

$d$  – zmierzona średnica próbki [mm].

### **3.3 Ocena zarabialności cementów oraz ich podatności na iniekcję i integralności w środowisku symulowanego płynu fizjologicznego (SBF)**

Ocenę podatności na iniekcję cementów wykonywano według własnej metody. Cementy przenoszono z płytki szklanej do odpowiednich strzykawek, z których wytłaczano je, stosując nacisk ręczny, do szalek Petriego z płynem symulującego naturalne środowisko organizmu (SBF). Każdorazowo wyjściowa objętość cementów poddawanych iniekcji wynosiła 2 ml i za każdym razem oceniano objętość wytłoczonego cementu do objętości masy cementu pozostającej w strzykawce. Cementy poddawano także ocenie wizualnej pod kątem integralności struktury.

### **3.4. Badania cytotoksyczności metodą bezpośredniego kontaktu cementów z fibroblastami mysimi**

Badania cytotoksyczności przeprowadzono według PN-EN ISO 10993 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Część 5: Badania in vitro cytotoksyczności” [7]. Zastosowano metodę bezpośredniego kontaktu próbek cementów z jednowarstwową hodowlą komórek fibroblastów mysich 3T3/Balb, otrzymanych z Banku Tkanek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Próbki cementów przygotowane w formie krążków o średnicy 10 mm i wysokości 1,5 mm zostały uprzednio poddane sterylizacji radiacyjnej. Hodowlę komórek prowadzono w płynie hodowlanym Eagle’a z dodatkami: 10-procentowej inaktywowanej (30 min, 56°C) surowicy cielęcej, 100 j/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny i 2mM/ml L-glutaminy w temp. 37°C, w atmosferze 5-procentowego CO<sub>2</sub>. Komórki przeszczepiano, stosując roztwór 0,05-procentowej trypsyny z 0,02-procentowym EDTA w PBS, o pH 7,2. Na przygotowaną hodowlę komórek nakładano próbne cementy i inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5-procentowego CO<sub>2</sub>. Każdy cement oceniano w trzech powtórzeniach.

Zmiany ilościowe i morfologiczne w wyhodowanych komórkach po kontakcie z badanymi cementami oceniono po 24, 48 i 72 h w odwróconym mikroskopie kontrastowo-fazowym. W celu określenia ilości martwych komórek zastosowano barwienie błękitem trypanu. Stopień toksyczności badanych cementów oceniono na podstawie zmian w morfologii komórek, ich przeżywalności i zdolności do proliferacji według kryteriów podanych w tab. 3.

T a b e l a 3

*Stopnie toksyczności testu kontaktu bezpośredniego*

Stopień	Toksyczność	Opis zmian w hodowlach
0	brak	Pojedyncze wewnątrzcytoplazmatyczne ziarnistości; nie stwierdza się lizy komórek
1	słabe	Około 20% komórek zaokrąglonych, obkurczonych, odklejających się od podłoża, bez zagęszczeń cytoplazmy; pojedyncze komórki rozzerwane
2	umiarkowana	Około 50% komórek zaokrąglonych, bez ziarnistości, rozległa liza komórek i puste przestrzenie między komórkami
3	średnia	Około 70% komórek zaokrąglonych; komórki uległy lizie
4	silna	Prawie całkowicie zniszczona hodowla komórkowa

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem testu *t*-Studenta. Przyjęto, że współczynniki korelacji są istotne przy:  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ .

## 4. Wyniki i dyskusja

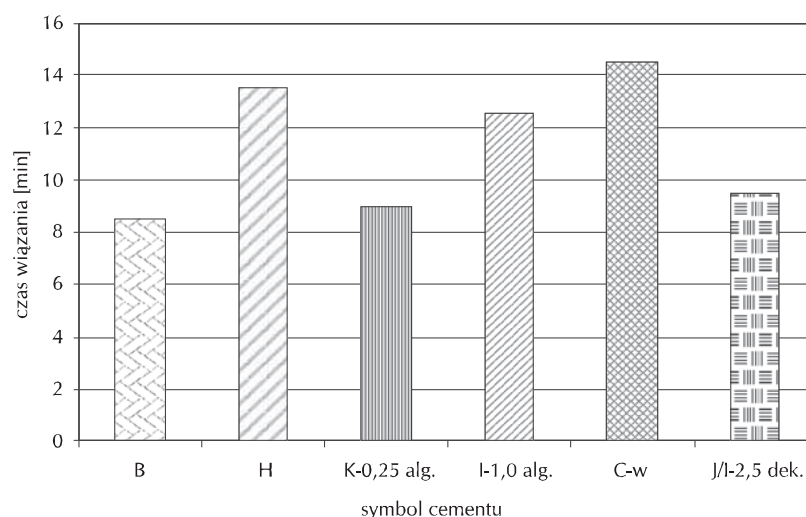
### 4.1. Wyniki badań czasu wiązania opracowanych cementów

Obecnie brakuje uregulowań normowych określających metody badań fizykochemicznych, dotyczących cementów do wypełniania ubytków kostnych.

Według J. Khairouna [5] praktyka kliniczna określa następujące wymagania dla cementów do wypełniania ubytków kostnych:

- cement powinien związać w czasie krótszym niż 15 min;
- wytrzymałość na ściskanie cementu powinna wynosić co najmniej 30 MPa.

Wyniki badań czasu wiązania opracowanych cementów przedstawiono na ryc. 1.



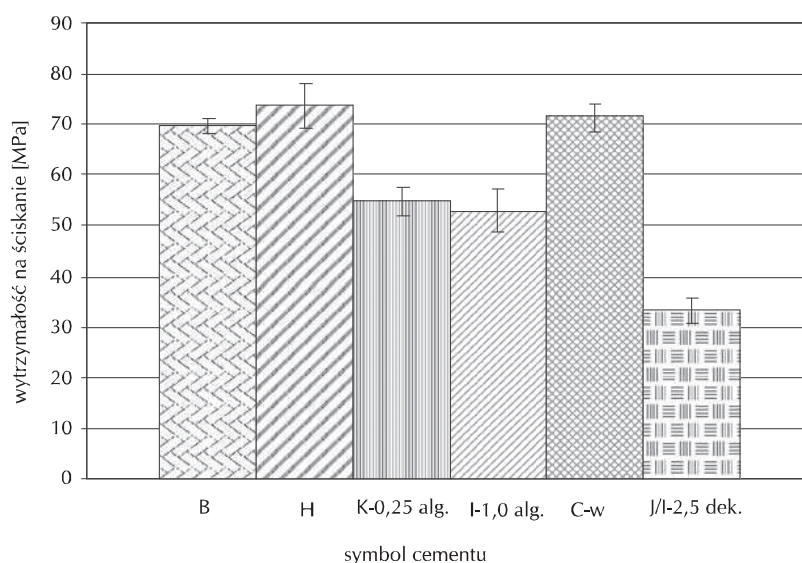
Ryc. 1. Czas wiązania cementów



Wszystkie badane cementy wiązały w przedziale 8–15min, co jest bardzo korzystne na tle danych literaturowych. Najdłuższe czasy wiązania wykazały cementy C-w, H i I-1,0 alg. (ryc. 1).

#### 4.2. Wyniki badań wytrzymałości na ściskanie opracowanych cementów

Wyniki badań wytrzymałości na ściskanie opracowanych cementów przedstawia ryc.2.



Ryc. 2. Wytrzymałość na ściskanie cementów po 24 h przetrzymywania w SBF

Jak już wspomniano, minimalną wartością wytrzymałości na ściskanie, akceptowaną przez klinicystów, według danych literaturowych jest 30 MPa. Uzyskane wyniki badań przedstawione na ryc. 2 dowodzą, że wszystkie badane cementy przekraczają ten poziom. Najwyższą wytrzymałością na ściskanie charakteryzowały się cementy oznaczone symbolami H, B i C-w.

#### 4.3. Omówienie obserwacji podatności na iniekcje i integralności struktury opracowanych cementów wapniowofosforanowych w kontakcie z SBF

W przypadku cementów B i H nie stwierdzono potrzeby modyfikacji ich składu, ponieważ cementy te łatwo wyciska się ze strzykawki i wykazują zwartość struktury po iniekcji do płynu SBF. Natomiast dla cementu K celowa była modyfikacja składu, by ograniczyć rozmywalność w SBF, co przedstawiają ryc. 3 i 4.



Ryc. 3. Cement K zarabiany wodnym roztworem bursztynianu sodu (12% wag.)



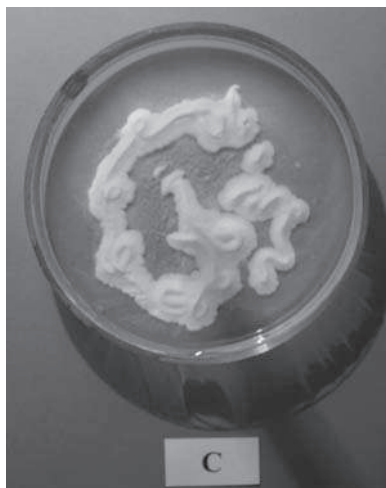
Ryc. 4. Cement K z dodatkiem alginianu sodu (0,25% wag.) zarabiany wodnym roztworem bursztynianu sodu (12% wag.)

Można stwierdzić, że cel związany z ograniczeniem rozmywalności cementu K w SBF został osiągnięty poprzez wprowadzenie alginianu sodu do komponentu proszkowego tego cementu w ilości 0,25% wag. Ta sól sodowa kwasu algoinowego jest łatwo rozpuszczalna w wodzie, natomiast w środowisku reakcji wiązania cementu wapniowofosforanowego przez reakcję z jonami wapnia prawdopodobnie powstaje trudnorozpuszczalny żel, co ogranicza zdolność penetracji cementów przez SBF.

Również cement I wymagał modyfikacji. Wykonano szereg prób i stwierdzono, że poprawę kohezji cementu I można uzyskać również, jak dla cementu K, poprzez wprowadzenie alginianu sodu do komponentu proszkowego. Również interesujące wyniki uzyskano dla cementu I modyfikowanego dodatkiem gliceryny do płynu.

Stosunkowo łatwo zarabiał się cement C, lecz po wyciśnięciu ze strzykawki rozmywał się w SBF – stąd podjęto także badania nad modyfikacją jego składu. Najwyżej oceniono cement zarabiany roztworem wodnym gliceryny, chociaż korzystną ocenę uzyskało również zastosowanie wody do jego aktywacji. Cement C zarabiany 30% wag. roztworu cytrynianu sodu i cement C z płynem zawierającym 0,1% wag. gliceryny przedstawiają ryc. 5 i 6.

Również zmodyfikowano skład cementu J/I. Wykonano wiele badań i stwierdzono, że po zastosowaniu roztworu wodnego soli dekstranu do zarabiania komponentu J/I otrzymuje się cement o bardzo łatwej zarabialności, który nie rozmywa się w SBF.



Ryc. 5. Cement C zarabiany roztworem cytrynianu sodu



Ryc. 6. Cement C zarabiany roztworem gliceryny (0,1% wag.)

Ryciny 7 i 8 przedstawiają zachowanie cementów J/I i J/I-2,5 dek. w SBF. Widoczny na ryc. 7 cement J/I zarabiany wodą nie rozmywa się w SBF, ale zmiana płynu na roztwór wodny soli dekstranu w ilości 2,5% wag. powoduje dużą łatwość homogenizacji masy cementowej, która podczas wyciskania ze strzykawki wykazuje dużą plastyczność. Rycina 8 przedstawia długie jednolite pasmo cementu z łatwością tworzące pętle i zawijasy, a jednocześnie nie deformujące się, nie łamiące, jak również nie rozpadające się na drobniejsze kawałki.



Ryc. 7. Cement J/I zarabiany wodą



Ryc. 8. Cement J/I zarabiany wodnym roztworem soli dekstranu (2,5% wag.)

Najlepsze rezultaty poprawy plastyczności cementu J/I uzyskano zatem z płynem będącym roztworem soli dekstranu w ilości 2,5% wag., co jest bardzo korzystne, gdyż dekstran zdolny jest do stymulowania wzrostu osteoblastów i może być pomocny we wspomaganie metabolizmu kości.

#### 4.4. Wyniki badań cytotoksyczności hodowli fibroblastów mysich po 24, 48 i 72 h kontaktu z opracowanymi cementami

W tabeli 4 przedstawiono wyniki badań cytotoksyczności w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24, 48 i 72 h w kontakcie z cementami B i H. W hodowlach po kontakcie i w hodowlach kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. We wszystkich hodowlach stwierdzono komórki w podziałach. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielania od podłoża ani lizy błon komórkowych. Proliferacja komórek w hodowlach kontrolnych i z cementami była prawidłowa. Gęstość komórek w hodowlach po kontakcie z cementami była wyższa w porównaniu do gęstości komórek w hodowlach kontrolnych. Odsetek komórek martwych po 72 h w hodowlach z badanymi cementami był niższy od odsetka komórek martwych w hodowlach kontrolnych. Po każdym badanym okresie w płynach hodowlanych obserwowano w pobliżu próbek liczne drobiny zdegradowanych cementów. Stwierdzono, że degradacja zwiększała się z upływem czasu i była największa po 72 h.

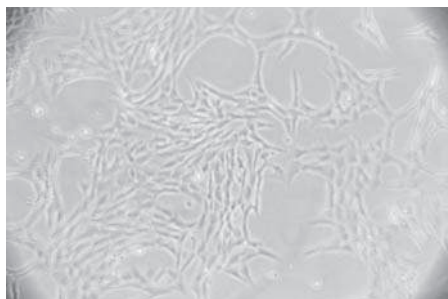
Tabela 4

*Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich w kontakcie z cementami B i H*

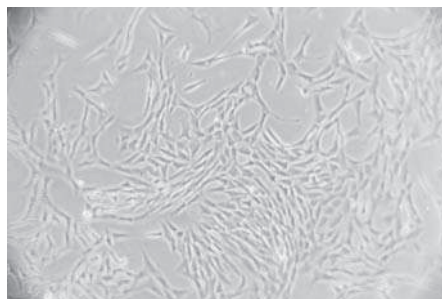
Parametr	Czas badania [h]	Rodzaj cementu			
		cement B	kontrola	cement H	kontrola
Zmiany morfologiczne	24	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	48	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	72	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
Gęstość komórek [ml x 10 <sup>6</sup> ]	24	0,82±0,026	0,76±0,030	0,84±0,026*	0,76±0,030
	48	1,46±0,314	1,28±0,230	1,38±0,243	1,28±0,230
	72	2,46±0,307	2,1±0,353	2,50±0,360	2,1±0,353
Komórki martwe [%]	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	1	3	1	3
Stopień toksyczności	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0

n. s.\* – nie stwierdzono.

\*\* – istotna różnica dla  $p < 0,05$ .



Ryc. 9. Kontrola hodowli fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem B



Ryc. 10. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem B

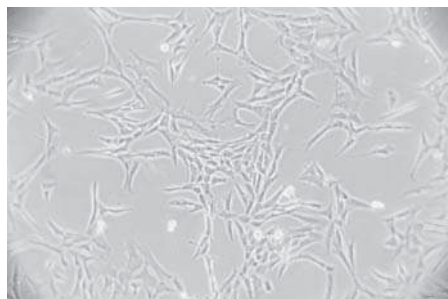
Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24, 48 i 72 h w kontakcie z cementami K-0,25 alg. i K przedstawia tab. 5. W hodowlach po kontakcie 24-, 48- i 72-godzinnym z próbkami cementu kostnego K i K-0,25 alg. oraz w hodowlach kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. We wszystkich hodowlach stwierdzono komórki w podziałach. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielenia od podłoża ani lizy błon komórkowych. W płynie hodowlanym widoczna była niewielka ilość wypłukanych drobin próbki. Proliferacja komórek w hodowlach kontrolnych i po kontakcie z cementami była prawidłowa. Gęstość komórek w hodowlach po kontakcie 48- i 72-godzinnym z cementami K i K-0,25 alg. była nieistotnie wyższa od gęstości komórek w hodowlach kontrolnych.

Tabela 5

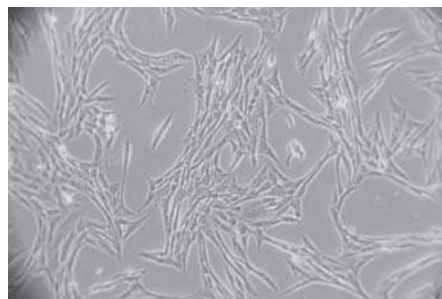
Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich w kontakcie z cementami K-0,25 alg. i K

Parametr	Czas badania [h]	Rodzaj cementu			
		cement K-0,25 alg.	kontrola	cement K	kontrola
Zmiany morfologiczne	24	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	48	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	72	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
Gęstość komórek [ml x 10 <sup>6</sup> ]	24	0,76±0,08	0,82±0,02	0,78±0,03	0,76±0,03
	48	1,46±0,09	1,36±0,02	1,30±0,2	1,28±0,2
	72	2,42±0,07	2,2±0,15	2,20±0,3	2,1±0,3
Komórki martwe [%]	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	1	1	2	3
Stopień toksyczności	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0	0

\*n. s. – nie stwierdzono.



Ryc. 11. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnej kontakcie z cementem K



Ryc. 12. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnej kontakcie z cementem K-0,25 alg.

Tabela 6 przedstawia zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24-, 48- i 72-godzinnej kontakcie z cementami I-1,0 alg. i I.

T a b e l a 6

*Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich w kontakcie z próbkami cementów I-1,0 alg. i I*

Parametr	Czas badania [h]	Rodzaj cementu			
		cement I-1,0 alg.	kontrola	cement I	kontrola
Zmiany morfologiczne	24	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	48	n. s.*	n. s.*	7% komórek obkurczonych, odklejonych od podłoża	n. s.*
	72	n. s.*	n. s.*	30% komórek obkurczonych, odklejonych od podłoża, aglutynacja	n. s.*
Gęstość komórek [ml x 10 <sup>6</sup> ]	24	0,68±0,02	0,72±0,01	0,72±0,02	0,76±0,03
	48	0,78±0,02**	1,1±0,17	0,98±0,1	1,24±0,15
	72	0,98±0,03***	1,3±0,1	1,36±0,7**	2,0±0,07
Komórki martwe [%]	24	0	0	0	0
	48	1	0	5	0
	72	1	0	15	0
Stopień toksyczności	24	0	0	0	0
	48	0	0	1	0
	72	0	0	2/3	0

\* n. s. – nie stwierdzono.

\*\* – istotna różnica dla  $p < 0,05$ .

\*\*\* – istotna różnica dla  $p < 0,01$ .

W hodowlach po kontakcie 24-, 48- i 72-godzinny z cementem I-1,0 alg. i w hodowlach kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. W płynie hodowlanym stwierdzono drobiny próbki. Prolifera-cja komórek w hodowlach po kontakcie z badanymi próbkami we wszystkich czasach badania była niższa w porównaniu do kontroli, a gęstość komórek po 48 i 72 h była istotnie mniejsza od gęstości komórek w hodowlach kontrolnych. Po 72 h kontaktu komórek z cementem I-1 alg. stwierdzono 1% komórek martwych. Natomiast w przypadku cementu I po 24 h komórki miały prawidłowe cechy morfologiczne, po 48 h około 7% komórek było obkurczonych, zaś po 72 h ilość ta wzrosła do 30%. Odsetek komórek martwych wyniósł aż 15%, zaś proliferacja komórek była istotnie niższa. Porównując zmiany morfologiczne tych dwóch cementów można stwierdzić, że dodatek 1% alginianu sodu do proszku wpłynął na obniżenie cytotoksyczności cementu.

W tabeli 7 przedstawiono zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24, 48 i 72 h w kontakcie z cementami C-w, C-0,1 gl. i C.

T a b e l a 7

*Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich w kontakcie z próbkami cementów C-w, C-0,1 gl. i C*

Parametr	Czas badania [h]	Rodzaj cementu					
		cement C-w	kontrola	cement C-0,1 gl.	kontrola	cement C	kontrola
Zmiany morfologiczne	24	n. s. *	n. s. *	n. s. *	n. s. *	n. s. *	n. s. *
	48	n. s. *	n. s. *	strefa zahamowania wzrostu, komórki obkurczone wokół próbki	n. s. *	n. s. *	n. s. *
	72	n. s. *	n. s. *	strefa zahamowania wzrostu, komórki obkurczone wokół próbki	n. s. *	15% komórek obkurczonych, odklejonych od podłoża, aglutynacja	n. s. *
Gęstość komórek [ml x 10 <sup>6</sup> ]	24	0,730,03	0,72 ± 0,01	0,66 ± 0,04	0,72 ± 0,01	0,74 ± 0,03	0,76 ± 0,03
	48	0,86 ± 0,02	1,1 ± 0,17	0,76 ± 0,01**	1,170,17	1,2 ± 0,1	1,24 ± 0,15
	72	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	0,98 ± 0,04***	1,3 ± 0,1	1,9 ± 0,05	2,0 ± 0,07
Komórki martwe [%]	24	0	0	0	0	0	0
	48	1	0	5	0	2	0
	72	2	0	12	0	7	2
Stopień toksyczności	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	1	0	0	0
	72	0	0	2	0	1/2	0

\* n. s. - nie stwierdzono.

\*\* - istotna różnica dla  $p > 0,05$ .

\*\*\* - istotna różnica dla  $p < 0,01$ .

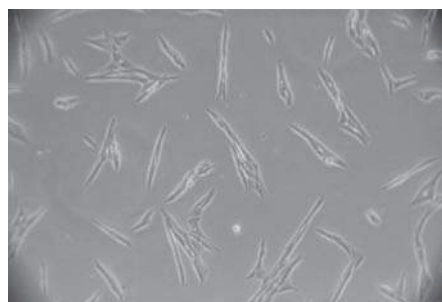
W hodowlach po 24-godzinnym kontakcie z cementami C-w, C-0,1 gl. i C oraz w hodowlach kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji, oddzielania od podłoża ani lizy błon komórkowych. Proliferacja komórek w hodowlach po kontakcie z badanymi cementami we wszystkich czasach badania była istotnie niższa w porównaniu do hodowli kontrolnych.

W hodowlach z cementem C po 72 h stwierdzono komórki obkurczone, odklejone od podłoża, które uległy aglutynacji, oraz wyższy odsetek komórek martwych w porównaniu do hodowli z cementem C-w. Stopień toksyczności po 72 h dla cementu C wyniósł 1/2, zaś dla cementu C-w – 0. Na tej podstawie można stwierdzić, że celowe było zastosowanie – zamiast roztworu cytrynianu sodu – wody destylowanej do zarabiania proszku o składzie  $\alpha$ TCP-DCPD.

W przypadku cementu C-0,1 gl. w hodowlach po 24 h nie stwierdzono zmian morfologicznych komórek. Jednak po 48 i 72 h, w bezpośrednim kontakcie z próbką, stwierdzono toksyczne oddziaływanie cementu, które manifestowało się bardzo małą liczbą komórek wokół próbki. Nieliczne komórki w sąsiedztwie materiału były obkurczone i odklejone od podłoża. Komórki w dalszej odległości od próbki nie wykazywały zmian morfologicznych. W płynie hodowlanym stwierdzono bardzo dużo drobin materiału. Proliferacja komórek w hodowlach po kontakcie z badanymi próbkami we wszystkich czasach badania była niższa w porównaniu z proliferacją w hodowli kontrolnej, a gęstość komórek po 48 i 72 h była istotnie mniejsza od gęstości komórek w hodowlach kontrolnych. Po 48 h kontaktu z badanymi próbkami stwierdzono 5% komórek martwych, a po 72 h – 12%. Na podstawie danych można stwierdzić, że zastosowanie roztworu gliceryny jako płynu do zarabiania cementu spowodowało nasilenie zmian cytotoksycznych.



Ryc. 13. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem C w bezpośrednim kontakcie z próbką; widoczne drobiny cementu

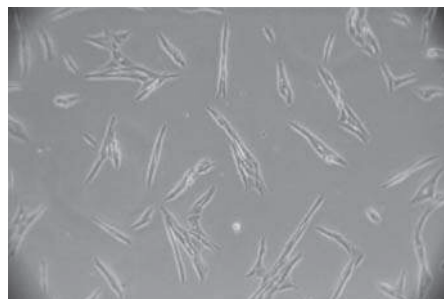


Ryc. 14. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem C-w





Ryc. 15. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem C-0,1 gl. w bezpośrednim kontakcie z próbką



Ryc. 16. Hodowla fibroblastów mysich 3T3 Balb/C po 48-godzinnym kontakcie z cementem J/I-2,5 dek.

W tabeli 8 przedstawiono zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich 3T3Balb/C po 24, 48 i 72 h w kontakcie z cementami J/I-2,5 dek. i J/I.

T a b e l a 8

*Zmiany cytotoksyczne w hodowli fibroblastów mysich w kontakcie z próbkami cementów J/I-2,5 dek. i J/I*

Parametr	Czas badania [h]	Rodzaj cementu			
		cement J/I-2,5 dek.	kontrola	cement J/I	Kontrola
Zmiany morfologiczne	24	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	48	n. s.*	n. s.*	n. s.*	n. s.*
	72	n. s.*	n. s.*	wokół próbki komórki obkurczone	n. s.*
Gęstość komórek [ml x 10 <sup>6</sup> ]	24	0,84±0,02	0,82±0,01	0,78±0,03	0,76±0,03
	48	1,42±0,04	1,36±0,02	1,24±0,08	1,24±0,15
	72	1,86±0,05	2,2±0,15	1,86±0,12	2,0±0,07
Komórki martwe [%]	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	2	1	7	2
Stopień toksyczności	24	0	0	0	0
	48	0	0	0	0
	72	0	0	0/1	0

\*n. s. – nie stwierdzono.

W hodowlach po 24-, 48- i 72-godzinnym kontakcie z cementami J/I i J/I-2,5 dek. oraz w hodowlach kontrolnych komórki przylegały do podłoża i miały prawidłowe cechy morfologiczne. W płynie hodowlanym widoczne były drobiny próbki. Proliferacja komórek w hodowlach kontrolnych i w próbach badanych była prawidłowa. Gęstość komórek w hodowlach po kontakcie z cementem – po 24 i 42 h – była nieistotnie wyższa, a po 72 h nieistotnie niższa od gęstości komórek w hodowlach kontrolnych. W hodowlach z cementami J/I po 72 h stwierdzono wokół cementu obkurczenie komórek i wzrost odsetka komórek martwych w porównaniu do hodowli z cementem J/I-2,5 dek. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że zastosowanie roztworu dekstranu sodu zamiast wody destylowanej spowodowało ograniczenie zmian morfologicznych komórek i zmniejszenie odsetka komórek martwych.

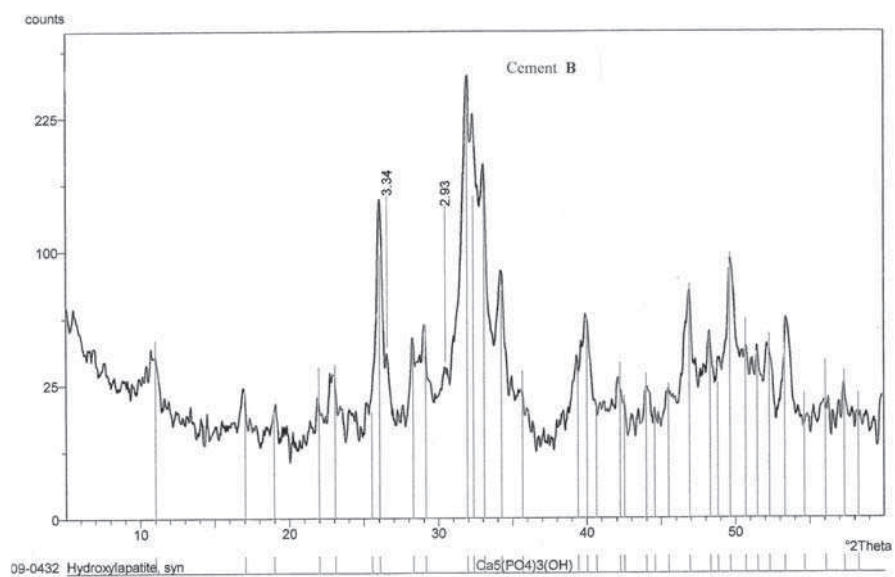
#### 4.5. Wyniki badań składów fazowych opracowanych cementów wapniowofosforanowych

Skład fazowy opracowanych cementów badano po 7 dniach inkubacji w SBF przy użyciu dyfrakcyjnej spektrometrii rentgenowskiej (XRD) [10]. Badania wykonano w Państwowym Instytucie Geologii na dyfraktometrze X'Pert PW 3020 firmy Philips. Oznaczono ilościowo zawartość hydroksyapatytu, stanowiącego główny składnik krystaliczny każdego opracowanego cementu, co przedstawiają tab. 9 i ryc. 17–22.

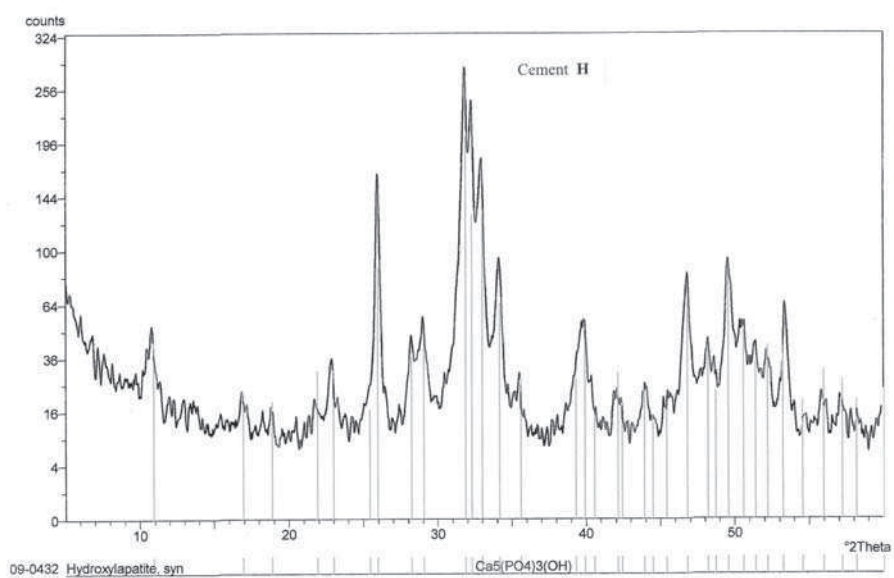
Tabela 9

*Zawartość hydroksyapatytu w badanych cementach [%]*

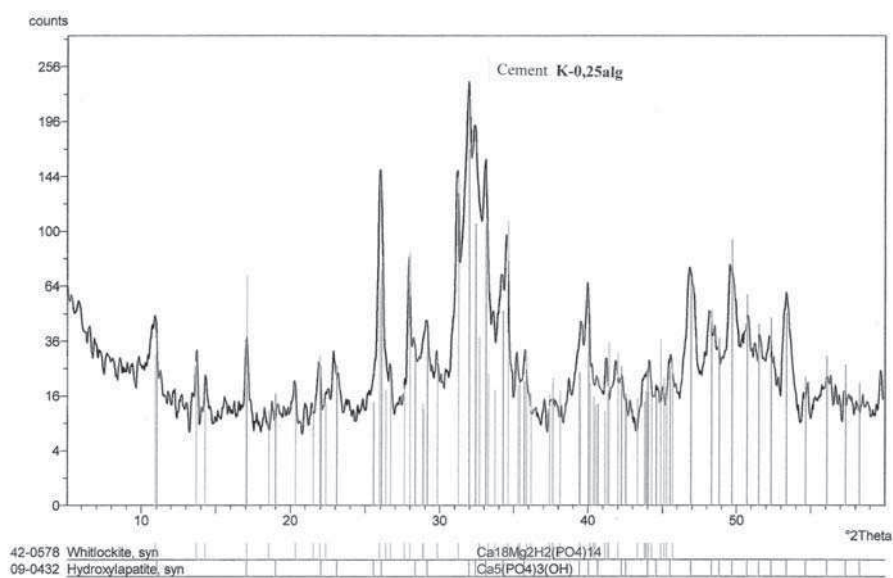
Symbol cementu	Zawartość
B	54
H	53
K-0,25 alg.	50
C-w	51
I-1,0 alg.	51
J/I-2,5 dek.	47



Ryc. 17. Dyfraktogram cementu B

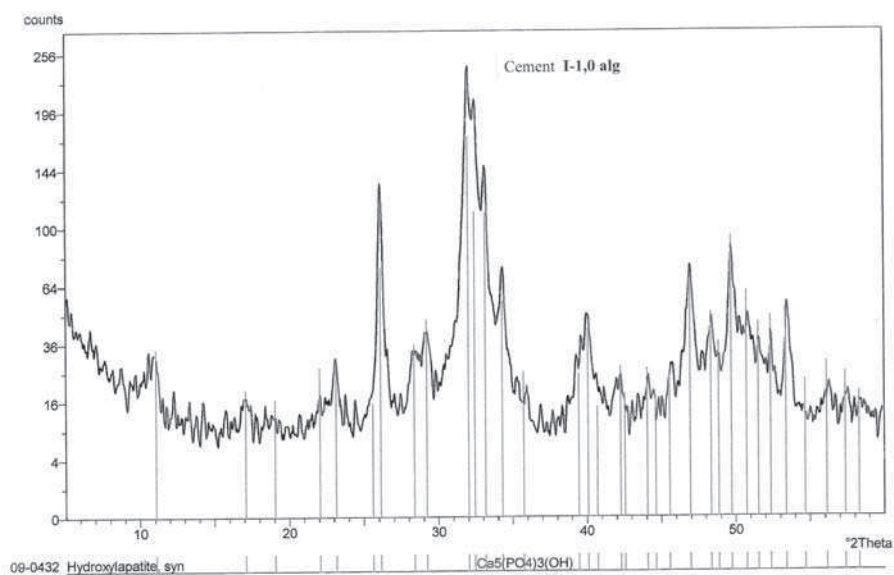


Ryc. 18. Dyfraktogram cementu H

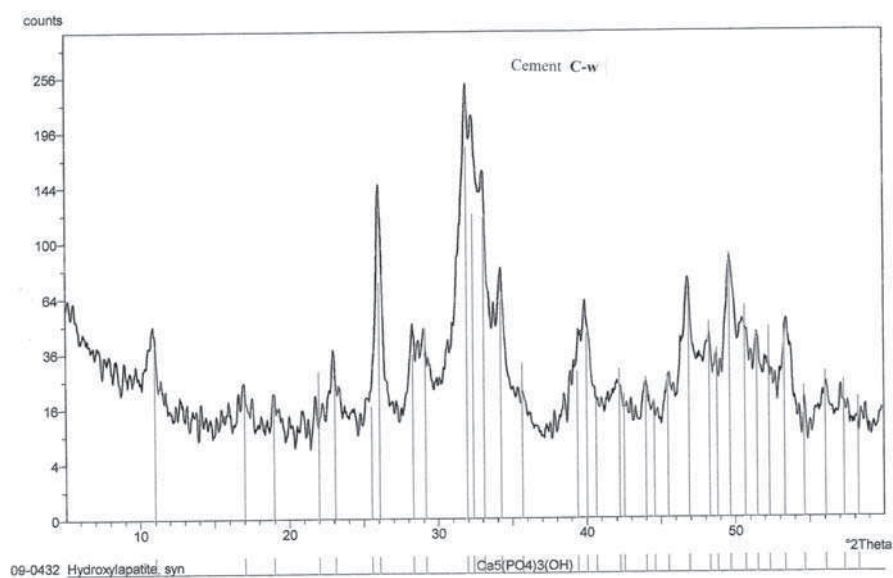


Ryc. 19. Dyfraktogram cementu K-0,25 alg.

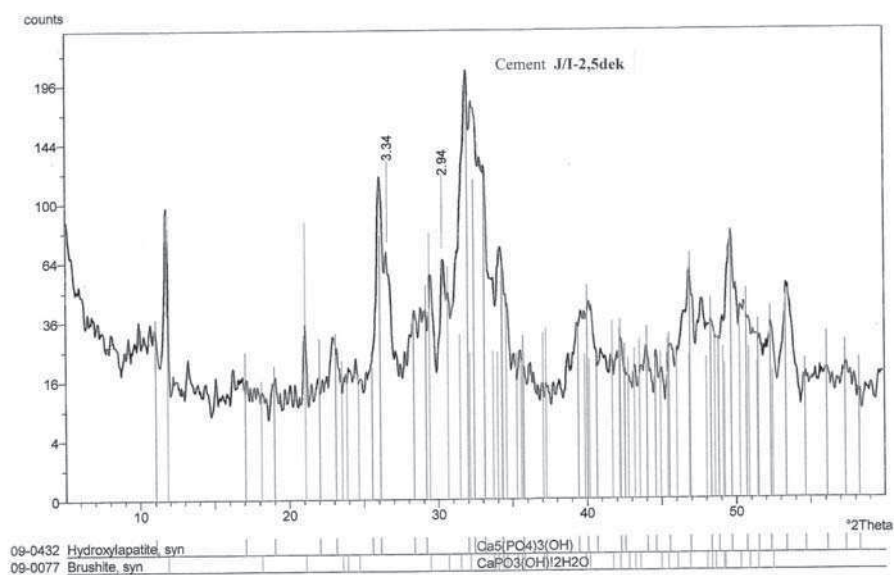
Z ryciny 19 wynika, że cement K-0,25 alg. po 7 dniach oprócz HA zawiera również pewne ilości  $\beta$ TCP, stanowiącego jeden z substratów.



Ryc. 20. Dyfraktogram cementu I-1,0 alg.



Ryc. 21. Dyfraktogram cementu C-w



Ryc. 22. Dyfraktogram cementu J/I-2,5 dek.

We wszystkich badanych cementach po 7 dniach inkubacji w SBF głównym składnikiem krystalicznym jest hydroksyapatyt. Na dyfraktogramach próbek cementów B i J/I-2,5 alg. występują piki przy wartościach  $d = 3,34\text{\AA}$  i  $2,94\text{\AA}$ , pochodzące od związku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Przeprowadzone badania wskazują również na obecność  $\beta\text{TCP}$  w cemencie K-0,25 alg., a w cemencie J/I-2,5 alg. bruszytu o wzorze  $\text{CaPO}_3(\text{OH})\cdot\text{H}_2\text{O}$ . Jednocześnie nie wykluczono występowania we wszystkich próbkach następujących związków chemicznych:

$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{NaHCO}_3-\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$  oraz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\cdot x\text{H}_2\text{O}$ .

## 5. Wnioski

1. Opracowane cementy wykazały czas wiązania i wytrzymałość na ściskanie spełniające przyjęte kryteria cytowane w literaturze.
2. W wyniku modyfikacji składów czterech cementów uzyskano poprawę ich zarabialności, podatności na iniekcję i integralności struktury w kontakcie z SBF.
3. Badania składu fazowego po 7 dniach inkubacji cementów w SBF potwierdziły biogodność opracowanych cementów wapniowofosforanowych z uwagi na wysoką zawartość hydroksyapatytu, co jest bardzo korzystne, gdyż HA stanowi zasadniczy składnik kości.
4. Na podstawie badań działania cytotoksycznego cementów wapniowofosforanowych przeprowadzonych po 24, 48 i 72 h na fibroblastach mysich 3T3/Balb stwierdzono, że:
  - cementy B i H nie wykazują działania cytotoksycznego;
  - cement K z dodatkiem alginianu sodu, jak i bez nie wykazywał działania cytotoksycznego. Natomiast pierwszy z nich wykazuje integralność struktury w SBF;
  - cement I bez dodatku alginianu sodu wywołuje efekt cytotoksyczny. Wprowadzenie do składu proszku alginianu sodu w ilości 1% wag. wpływa na ograniczenie cytotoksyczności;
  - zastosowanie wody destylowanej do zarabiania proszku C, zamiast roztworu 30% wag. cytrynianu sodu, wpłynęło na uzyskanie zmodyfikowanego cementu C-w pozbawionego działania cytotoksycznego na fibroblasty mysie;
  - zastosowanie roztworu gliceryny 0,1% wag. do zarabiania wymienionego proszku powoduje to, że uzyskany cement C-0,1 gl. w kontakcie z hodowlą fibroblastów mysich wykazuje strefę zahamowania wzrostu komórek i stosunkowo wysoki odsetek komórek martwych;
  - zastosowanie zamiast wody destylowanej do zarabiania proszku J/I roztworu dekstranu sodu nie spowodowało w hodowlach zmian morfologicznych komórek, które obserwowano w hodowlach w kontakcie z cementem J/I zarabianym wodą. Zmodyfikowany cement zarabia się bardzo łatwo i nie rozmywa się w SBF.

## Literatura

- [1] Bohner M. i in., *Technological issues for development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment*, „Biomaterials” 2005, No 26, s. 6423–6429.
- [2] Elena F. Burguerai in., *Injectable calcium phosphate cement: Effects of powder-to-liquid ratio and needle size*, „Journal of Biomedical Materials Research”. Part B: „Apl. Biomater.” 2008, No 84B, s. 493–502.
- [3] Fernandez E. i in., *High-strength apatic cement by modification with superplasticizers*, „Biomaterials” 2005, No 26, s. 2289–2296.
- [4] Hugo Leonardo Rocha Alves i in., *Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement*, „Journal of Biomedical Materials Research” 2008, No 19, s. 2241–2246.
- [5] Khairoun I. i in., *Limited compliance of some apatitic calcium phosphate bone cements with clinical requirements*, „Journal of Biomedical Materials Research” 1998, No 9, s. 667–671.
- [6] Ming - You Shie i in., *Immersion behavior of gelatin-containing calcium phosphate cement*, „Acta Biomaterialia” 2008, vol. 4, s. 646–655.
- [7] PN-EN ISO 10993-5 „Biologiczna ocena wyrobów medycznych. Badania cytotoxyczności – metody in vitro”, 2001.
- [8] PN-EN ISO 29917-1:2005 „Stomatologia. Cementy wiążące z udziałem wody. Część 1: Cementy kwasowo-zasadowe w postaci proszku i płynu”.
- [9] Polesiński Z., Karaś J., *Cementy kostne i stomatologiczne*, [w:] *Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna* 2000, t. 4: 2003, s. 179–209.
- [10] Xiupeng Wang i in., *Control of crystallinity of hydrated products in a calcium phosphate bone cement*, „Journal of Biomedical Materials Research” 2007, 81A, s. 781–790.
- [11] Xiupeng Wang i in., *Influence of anti-washout agents on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate cement*, „Journal of Biomedical Materials Research”. Part B: „Apl. Biomater.” 2007, No 81B, s. 410–418.

JOANNA KARAŚ  
STANISŁAW PIELKA  
DANUTA PALUCH  
LIDIA CIOŁEK

### THE EVALUATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND CYTOTOXICITY OF THE OBTAINED CALCIUM PHOSPHATE CEMENTS FOR FILLING BONE DEFECTS IN MEDICAL APPLICATIONS

The aim of the research was to evaluate of physicochemical properties and biocompatibility of the obtained calcium phosphate cements, intended for filling bone defects in surgery by means of injection. All obtained cements were compared in terms of the setting time, compressive strength, handling properties, injectability and integrity in SBF. Analysis of cytotoxicity of cements in immediate contact with 3T3 Balb/C mouse fibroblasts has been performed. It was demonstrated that it can improve the properties of calcium phosphate cement by modification its compositions to obtain injectable, bio-compatible cements suitable for the clinical use.