

Raport sintetic final

Perioada 05 octombrie 2011- 05 octombrie 2016

Titlul proiectului: *Noi biocompozite de tip alumina/zirconiu pentru implanturi ortopedice si dentare: corelatii intre proprietatile structurale si evaluarea biocompatibilitatii*

Cod: PN II ID PCE-2011-3-0441

Contract nr. 237/05.10.2011

Director:

Prof. dr. **habil. SIMONA CAVALU**, Universitatea din Oradea, Facultatea de Medicina si Farmacie, Departamentul de Stiinte Preclinice, P-ta 1 Decembrie 10, Oradea, tel/fax 0259 435680

Obiectiv general: Producerea, caracterizarea proprietatilor structurale/mecanice si evaluarea biocompatibilitatii unor noi bioceramici pe baza de alumina/zirconiu.

Etapa I

Având în vedere creșterea numărului de pacienți afectați de traumatisme ortopedice, dar și creșterea vârstei medie de viață a populației, a devenit necesară o intensificare a activităților de cercetare în domeniul biomaterialelor destinate înlocuirii țesutului osos. Tendințele actuale sunt orientate spre înlocuirea protezelor (implanturilor) metalice cu cele din diverse tipuri de ceramici, datorită limitării legate de investigațiile RMN. Noile ceramici pe baza de alumina/zirconiu au un potențial deosebit pentru a fi utilizate în acest scop, datorită biocompatibilității și rezistenței mecanice speciale. Alumina (Al_2O_3) prezintă proprietăți excelente din punct de vedere al rezistenței la uzura, stabilitate chimică și hidrotermică, dar este totuși casantă. Oxidul de zirconiu (ZrO_2) a fost introdus pentru a depăși această problemă, deoarece, în comparație cu alumina, are o rezistență mai mare la efort, iar printr-o manufacturare adecvata, poate dobândi o rezistență sporită la fractura. Este însă instabil din punct de vedere structural, deoarece poate foarte ușor suferi o transformare a fazei cristaline din forma tetragonală în cea monoclinică. Acest inconvenient poate fi înălțat prin adăugarea unor stabilizatori de fază, de exemplu Y_2O_3 sau CeO_2 . Înțelegând de la aceste premise, ceramicile de tip alumina/zirconiu au fost introduse în artroplastie începând cu anul 1960 de către J. Charnley [1].

In prima etapa de implementare a proiectului nostru s-a efectuat producerea și investigarea modificărilor structurale ale unor noi biocompozite ceramice de tip alumina/zirconiu, având valori diferite ale raportului procentual $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$, respectiv de tip $(100-x)\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{ZrO}_2$ unde $x = 0; 10; 20; 30$ vol% . S-a utilizat tehnica de sinterizare în plasma, la temperaturi între 1300-1460 °C și o presiune de 40 MPa. Analiza structurală a acestor compozite a fost realizată prin înregistrarea și interpretarea spectrelor FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) și XRD (X Rays Diffraction) ale probelor având compozitii diferite (fig.1).

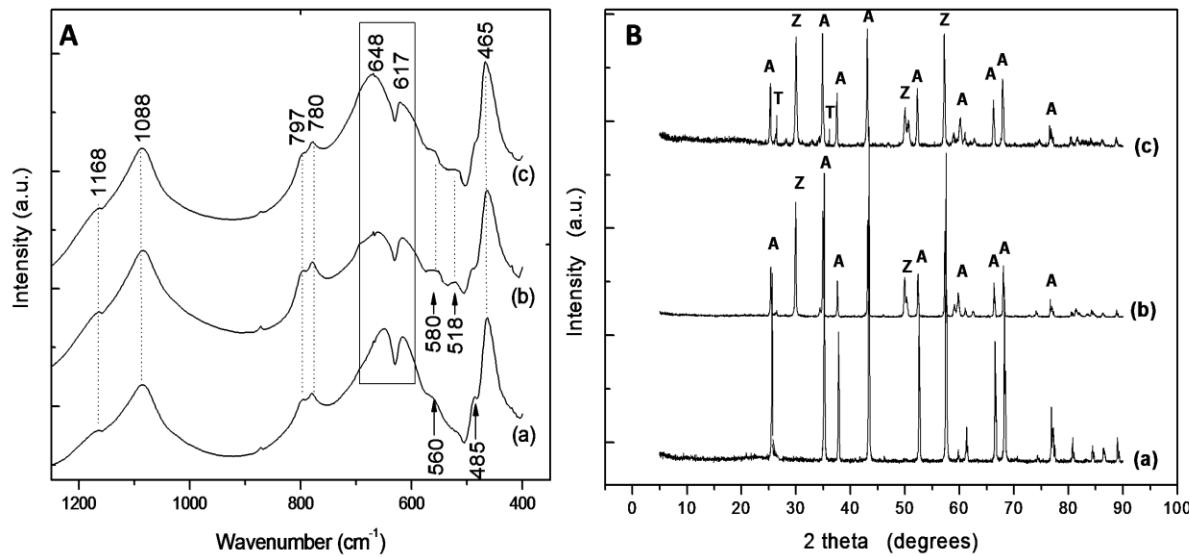


Fig. 1 Spectrele FTIR (A) și XRD (B) ale specimeneelor având compozitia $(100-x)\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{ZrO}_2$, unde $x = 0; 10; 20; 30$.

Spectrele FTIR au demonstrat o reorganizare structurală pe masura ce se modifică compozitia procentuala a specimeneelor. Prin adăugarea ZrO_2 , se observă o creștere în intensitate a benzii de absorbtie 515 cm^{-1} datorita vibratiilor Zr-O în faza tetragonală a ZrO_2 , care de altfel sunt vizibile și în spectrele XRD. Cel mai pronunțat efect se observă la benzile 617 și 648 cm^{-1} care se reduc la minim odata cu creșterea conținutului procentual de ZrO_2 . În același timp, spectrele XRD evidențiază liniile de reflexie care provin din planele cristalografice ale alpha Al_2O_3 (corundum) la $2\theta = 25.6; 35.2; 37.9; 43.4; 52.6; 57.5; 61.3; 66.4; 68.2; 76.9$ și 80.7° , respectiv tetragonal ZnO_2 , la $2\theta = 29.9; 49.9; 59.1; 59.7$ și 62 . S-a remarcat o scadere a intensitatii liniilor corespunzatoare fazei Al_2O_3 acompaniata de o crestere în intensitate a liniilor ZrO_2 odata cu cresterea continutului procentual de la 10 la 30%.

Etapa II

In această etapă s-a urmărit investigarea modificărilor structurale și morfologice ale compozitelor $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ induse de modificarea raportului procentual și de adaugarea oxizilor TiO_2 respectiv CeO_2 . De asemenea s-a efectuat studiul proprietăților mecanice ale compozitelor având diferite valori procentuale de Al_2O_3 respectiv ZrO_2 , cu sau fără adăos de TiO_2 sau CeO_2 . Analiza structurală a compozitelor a fost realizată prin înregistrarea și interpretarea spectrelor FTIR, conform **fig.2**.

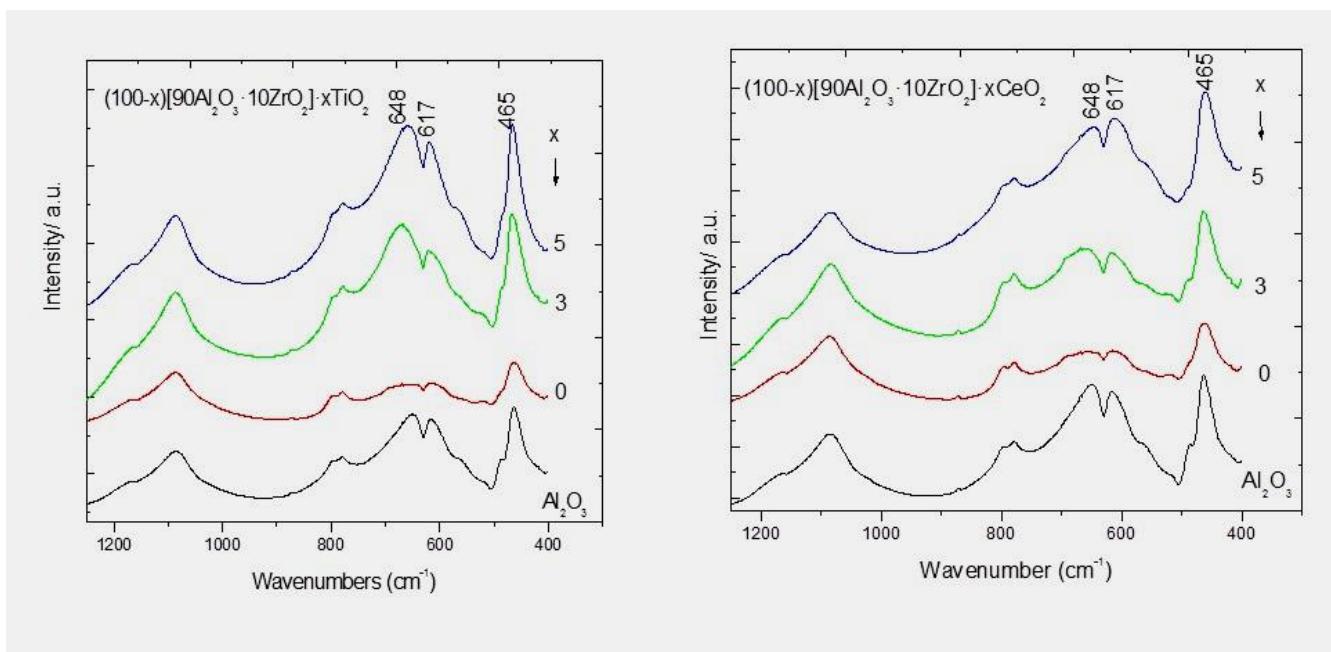


Fig. 2 Spectrele FTIR ale compozitelor $(100-x)[90\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{ZrO}_2] \cdot x\text{TiO}_2$ respectiv $(100-x)[90\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 10\text{ZrO}_2] \cdot x\text{CeO}_2$. Adaosul de oxizi TiO_2 respectiv CeO_2 s-a facut in procent de 3% si respectiv 5%

S-a observat că după adăugarea TiO_2 (respectiv CeO_2) la matricea de alumina/zirconiu, intensitatea relativă a benzilor $648/617 \text{ cm}^{-1}$ este considerabil modificată deoarece apare o suprapunere a benzilor caracteristice ale oxidului de titaniu (ceriu) în aceasta regiune. Cea mai pronunțată modificare se observă în legătura cu benzile caracteristice ale aluminei (617 și 648 cm^{-1}) în urma creșterii procentului de ZrO_2 și este atribuită modificărilor structurale care afectează vibratiile grupării AlO_6 . Nu s-a observat prezența fazei tetragonale în niciunul dintre compozite, asa după cum s-a remarcat și în spectrele XRD, deci s-a confirmat astfel stabilitatea compozitelor investigate. Rezultatele obținute au o importanță deosebită deoarece se cunoaște faptul că

mecanismul de calire al ceramicelor de tip alumina/zirconium este puternic influentat de proprietatile structurale, datorita in special prezentei oxidului de zirconiu, care are o comportare versatila. La presiunea ambientala, zirconatul poate avea diferite forme cristaline: cubic, tetragonal si monoclinic, cu diferite densitati atomice [2,3]. In acest caz, in urma sinterizării în plasma la temperaturi inalte si o presiune de 40MPa, zirconatul si-a mentinut stabilitatea fazei cristaline. Au fost deasemenea investigate detaliile ultrastructurale ale acestor compositi, prin microscopie electronică SEM. In fig. 3 sunt prezentate comparativ câteva imagini sugestive.

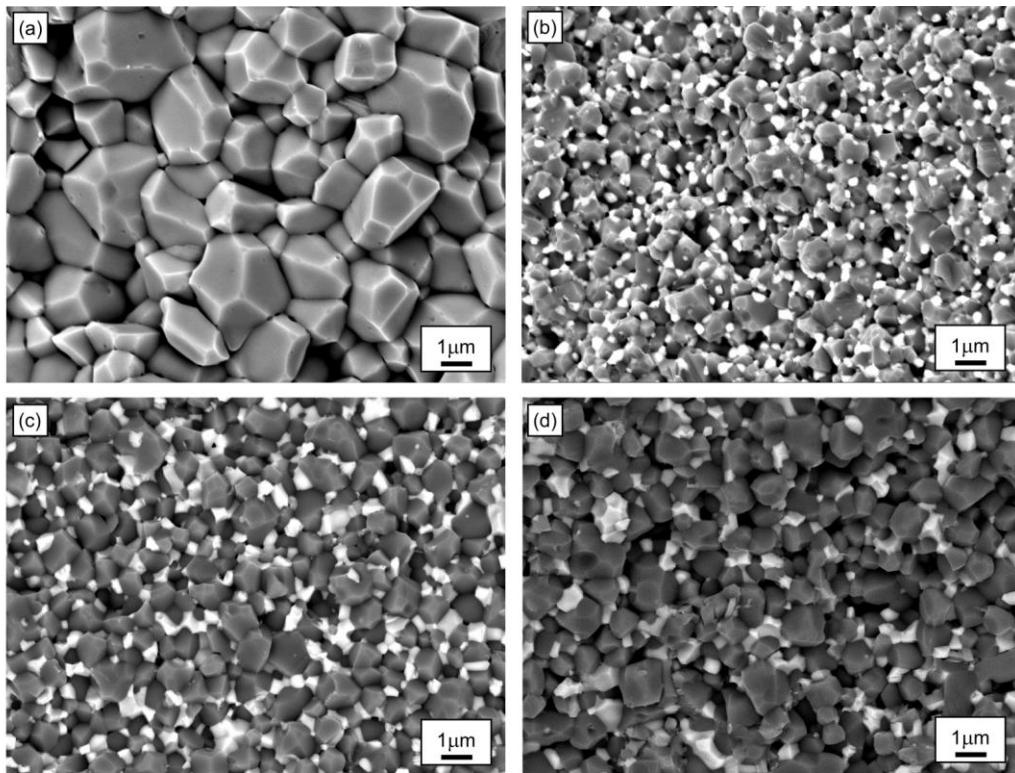


Fig. 3 Imagini de microscopie SEM inregistrate pe suprafata compositelor: Al_2O_3 sinterizat la $1350^{\circ}C$ (a); $90\%Al_2O_3\text{--}10\%ZrO_2$ sinterizat la $1400^{\circ}C$ (b); $90\%Al_2O_3\text{--}10\%ZrO_2\text{--}3\%TiO_2$ (c), si $90\%Al_2O_3\text{--}10\%ZrO_2\text{--}5\%TiO_2$ (d) sinterizat la $1350^{\circ}C$ timp de 300 s.

Detaliile microscopice au evidențiat dimensiunea și forma granulelor de alumina și zirconat (alumina de culoare gri, dimensiune de ordinul micronilor, iar zirconatul de culoare alba, dimensiune sub-micron), și mai mult, faptul ca prin sinterizarea în plasma, densificarea compositelor se poate realiza la o temperatură mai joasă și într-un timp mai scurt dacă prin tehnicile convenționale. Mai exact, microstructura și dimensiunea granulelor poate fi controlată printr-o rată rapidă de încălzire, într-un timp scurt de procesare. Spre exemplu, modificând procentul de ZrO_2 de la 10% până la 20%, s-a observat o reducere a dimensiunii granulelor, pe

când prin adăugarea de 3% respectiv 5 wt.% TiO_2 în matricea de alumina/zirconiu, dimensiunea granulelor a crescut (pană la 0.4–0.7 μm respectiv 0.8–1.8 μm).

S-au efectuat deasemenea teste de rezistență mecanică asupra tuturor compozitelor. În figura 4 sunt reprezentate curbele pentru indicele de duritate Vickers în cazul Al_2O_3 sinterizat la 1350°C și al compozitelor Al_2O_3 -YSZ cu și fără TiO_2 , sinterizate la 1350°C respectiv 1400°C, timp de 300 s, și o forță de încarcare de 9.8 N. În urma analizei rezultatelor, s-a observat faptul că compozitele Al_2O_3 -YSZ fără TiO_2 prezintă o duritate mai mare decât Al_2O_3 , iar duritatea biocompozitelor scade de la valoarea de 20.7 GPa până la 19.9 GPa atunci când conținutul de YSZ crește de la 10% la 20 vol%. Duritatea compozitelor Al_2O_3 -YSZ descrește semnificativ odată cu adăugarea 3% TiO_2 , iar adaosul suplimentar duce la scăderea durității.

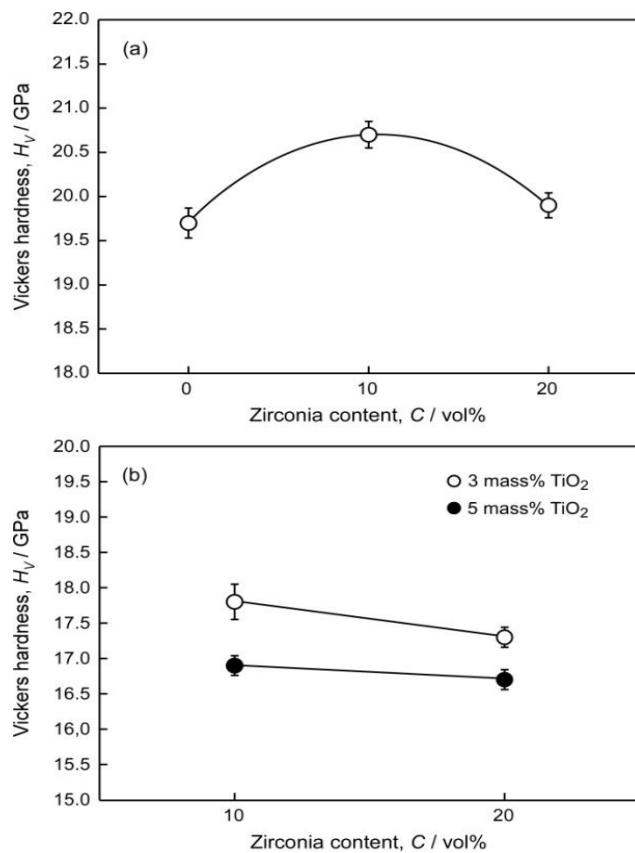
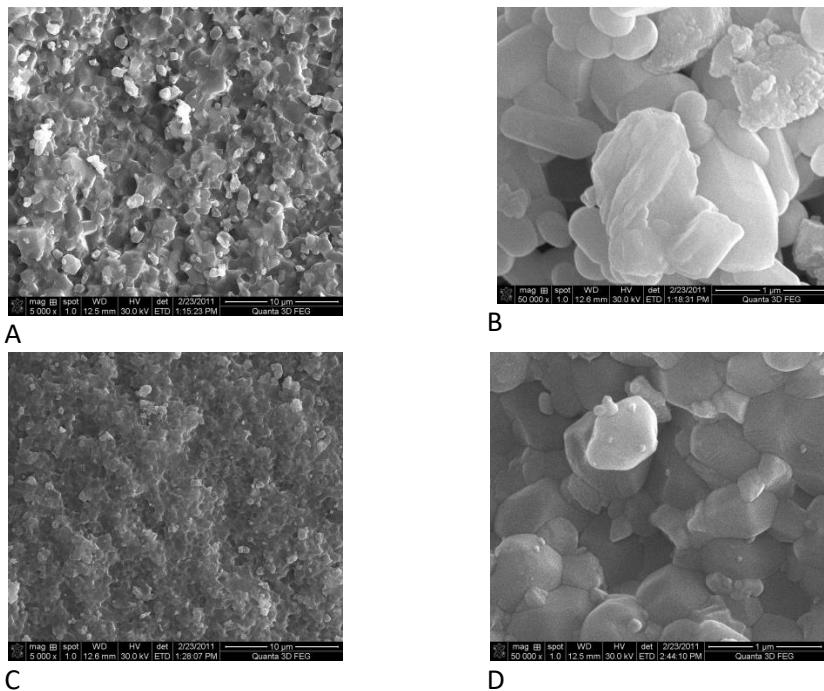


Fig. 4: Efectul adaosului de YSZ respectiv TiO_2 reflectat în coeficientul de duritate Vickers a compozitelor Al_2O_3 -YSZ.

Etapa III

In această etapă s-a urmarit investigarea modificărilor de suprafață, după diferite tratamente pe baza de fluor, aplicate specimenelelor $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$. Aceste studii au fost urmate de o testare preliminară a biocompatibilității materialelor *in vitro* și *in vivo*.

Se cunoaște faptul că modificările de suprafață și diferențele tratamente chimice post-sinteză influențează performanțele bioceramicelor destinate aplicațiilor dentare și ortopedice. Conform unor studii anterioare, s-a demonstrat că administrarea unui complex de fluoruri poate fi eficientă în prevenirea cariilor timpurii [4-6]. Spre exemplu, fluorura de staniu s-a dovedit mai eficientă decât fluorura de sodiu atât pentru preventia cariilor dentare, dar și în controlul gingivitelor. În ceea ce privește aplicatiile ortopedice, NaF s-a dovedit eficientă în tratamentul osteoporozei vertebrale, având un efect de stimulare a noului os. În aceasta etapă au fost investigate modificările de suprafață a unor specimene cu compozitie variabilă, în urma tratării cu SnF_2 și NaBF_4 . Specimenele selectate au avut urmatoarea compozitie: **1)** Al_2O_3 ; **2)** 80% Al_2O_3 -20%YSZ; **3)** 80% Al_2O_3 -20%YSZ+ 5% TiO_2 . Imaginele de microscopie electronica SEM ale suprafețelor celor trei specimene înainte de tratament sunt prezentate în fig 5:



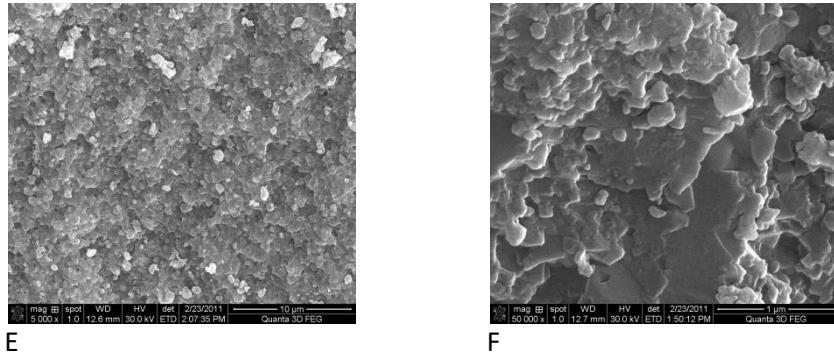


Fig. 5 Imaginele de microscopie electronica (SEM) inregistrate pe suprafața specimenelor cu compozиtiile: Al_2O_3 (A,B), 80% Al_2O_3 -20%YSZ (C,D) respectiv 80% Al_2O_3 -20%YSZ+ 5% TiO_2 (E,F).

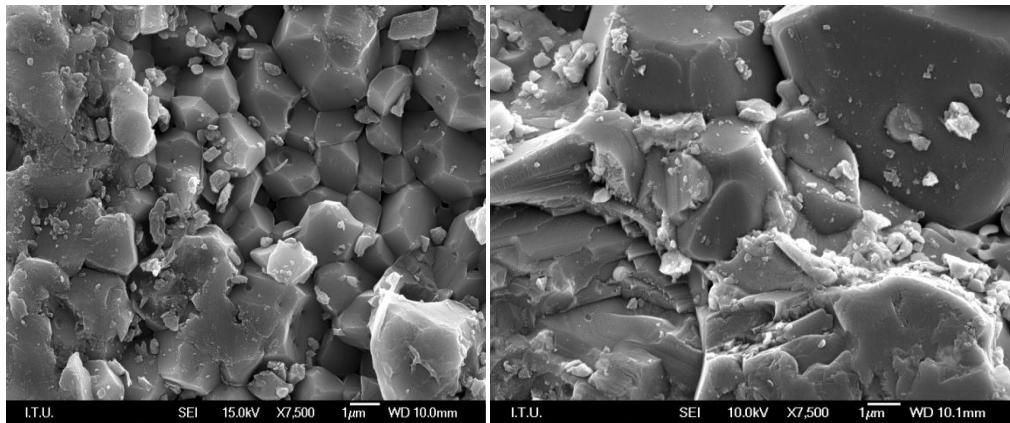


Fig. 6 Morfologia suprafetei ceramice Al_2O_3 in urma tratamentelor chimice cu a) SnF_2 respectiv b) $NaBF_4$.

Suprafețele tratate cu ambele fluoruri au fost analizate prin tehnici de înaltă sensibilitate: SEM, FTIR și respective XPS (X Rays Photoemission Spectroscopy). În fig. 6 sunt prezentate imagini SEM inregistrate după tratarea cu fluoruri (pentru exemplificare s-a ales numai proba Al_2O_3), iar în fig. 7 sunt prezentate spectrele XPS ale specimenelor înainte și după tratarea cu fluoruri, iar în tabelul 1 este redată compoziția elementală pe suprafața specimenelor, determinată din spectrele XPS (contaminarea cu carbon a fost eliminată). Rezultatele obținute atât prin spectroscopie FTIR cât și XPS au demonstrat o bună corelare din punct de vedere calitativ și cantitativ. Concluzia studiului a fost ca tratamentul cu SnF_2 este mai eficient decât cel cu $NaBF_4$, pentru toate specimenele investigate. Pentru a evalua proprietățile de aderare după aplicarea acestor tratamente, suprafetele tratate au fost acoperite uniform cu un strat de ciment acrilic comercial (pe bază de PMMA) și a fost aplicată manual o presiune timp de 15 minute. Dupa secționarea

transversala a specimenelelor, imaginile de microscopie electronica dovedesc faptul ca tratamentul cu SnF_2 favorizeaza aderarea cimentului acrilic, interfața prezintă o zonă de contact fără spații libere sau fisuri în stratul de ciment, după cum se observă în fig. 8.

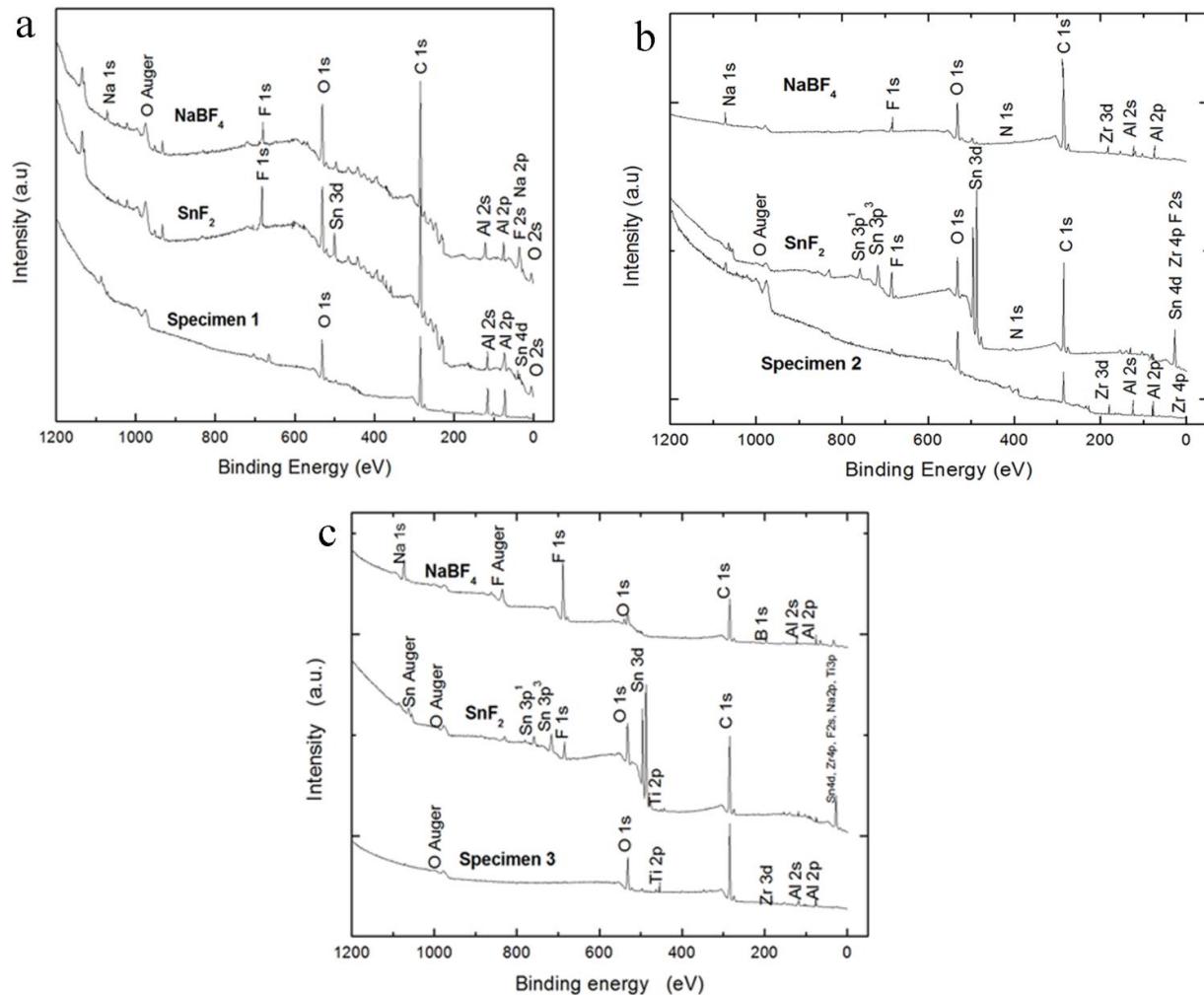


Fig.7 Spectrele de fotoemisie electronică XPS înregistrate pe suprafața specimenelelor (a) specimen 1, (b) specimen 2 și (c) specimen 3 înainte și după tratamentul cu SnF_2 și NaBF_4 .

Tabelul 1 Compozitia elementala pe suprafața specimenelelor, determinata din spectrele XPS (contaminarea cu carbon a fost eliminata).

Specimen	Compozitia elementala (at %)			
	Sn	F		Na
		SnF_4	NaBF_4	
1	3.4	4.9	3.2	2.1
2	12.8	3.9	2.4	1.9
3	12.4	3.3	6.8	4.2

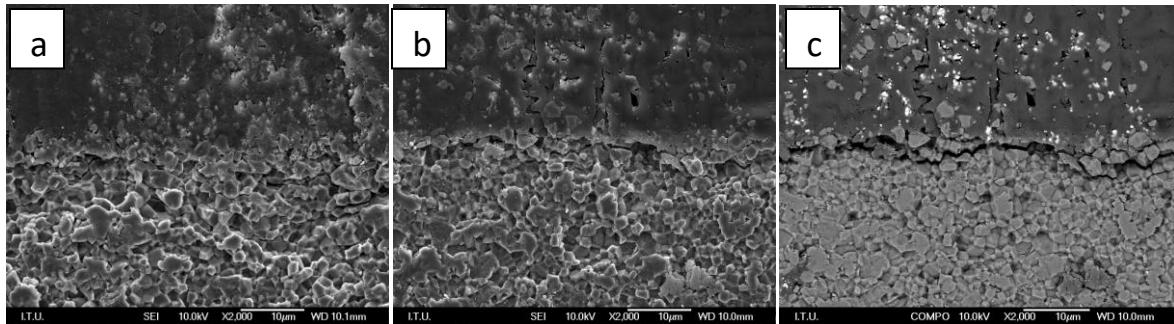


Fig. 8. Zona de interfata dintre suprafata ceramica si cimentul acrilic (sectiune transversala); a) specimenul tratat cu SnF_2 , b) specimenul tratat cu NaBF_4 , c) aceeasi imagine ca si b) dar inregistrata in modul "back scattering" pentru a evidenta detaliile.

Pentru testarea preliminară *in vitro* au fost selectate următoarele specimene: $75\text{Al}_2\text{O}_3 - 25\text{ZrO}_2$ (specimen 1) respectiv $75\text{Al}_2\text{O}_3 - 25\text{ZrO}_2 + 3\% \text{CeO}_2$ (specimen 2). Acestea au fost pregătite sub forma de discuri cu diametrul de 10 mm și grosimea 1 mm. Celulele fibroblastice HFL-1 au fost menținute în mediu Dulbecco modificat (DMEM) conținând 4.5 g/L glucoza și nutrient Ham's F12, 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamina, 1% penicilina/streptomicina, 1% aminoacizi ne-esențiali la 37°C , în atmosferă 5% CO_2 și 95% umiditate relativă. Celulele au fost incubate împreună cu materialele selectate timp de 24 h, la o concentrație de $5 * 10^4$ în mediul de cultură. Fixarea lor s-a efectuat cu soluție de paraformaldehida (4%) timp de 15 min la temperatură camerei.

Este cunoscut faptul că testele de citotoxicitate relevă doar efectele limitate la primele 12-24 de ore de incubare după ce celulele au fost expuse în contact cu un corp străin. Testele MTT reprezintă o cale rapidă și eficientă, bazată pe metode colorimetriche, de a detecta capacitatea unei enzime mitochondriale (dehidrogenază) de a transforma compusul 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) care este solubil în apă și are culoarea galbenă, într-un produs de reacție de culoare purpurie, numit formazan. Acest produs, dizolvat în DMSO, este un marker pentru evidențierea viabilității celulelor, în urma determinării absorbantei pe cale spectrofotometrică. În fig. 7 sunt prezentate rezultatele testului MTT după expunerea culturilor de fibroblastă în contact cu cele două specimene, proba de control (martor) fiind un implant comercial din titaniu. Analiza statistică a fost efectuată conform literaturii de specialitate după metoda Mosmann [7].

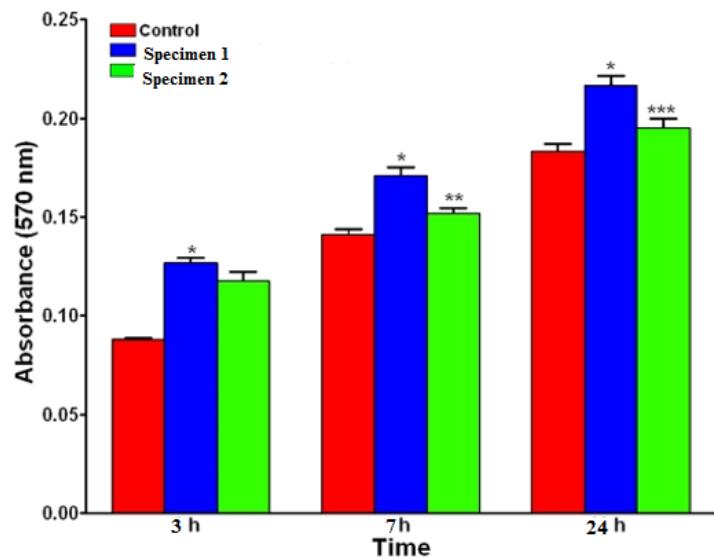


Fig. 7 Rezultatele testelor MTT demonstreaza viabilitatea celulelor fibroblaste evaluate la 3, 7 and 24 de ore. Semnul * indica $p<0.001$ fata de control, **indica $p<0.01$ iar *** indica $p<0.001$ fata de specimenul 1.

Rezultatele au demonstrat ca specimenele selectate nu prezinta efecte citotoxice in raport cu celulele fibroblaste HFL-1, iar rata de supravietuire celulara este buna in comparatie cu materialul ales ca si referinta.

Etapa IV

In aceasta etapa au fost efectuate teste de biocompatibilitate *in vivo*, utilizand un model animal mic (Wistar rats). Pentru testele *in vivo*, ceramicile avand componitie variabila (valori diferite ale raportului $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$) au fost utilizate sub forma granular-neregulata, plasate in defectele create in femurul de sobolan cu ajutorul unor freze trephine (fig. 8).

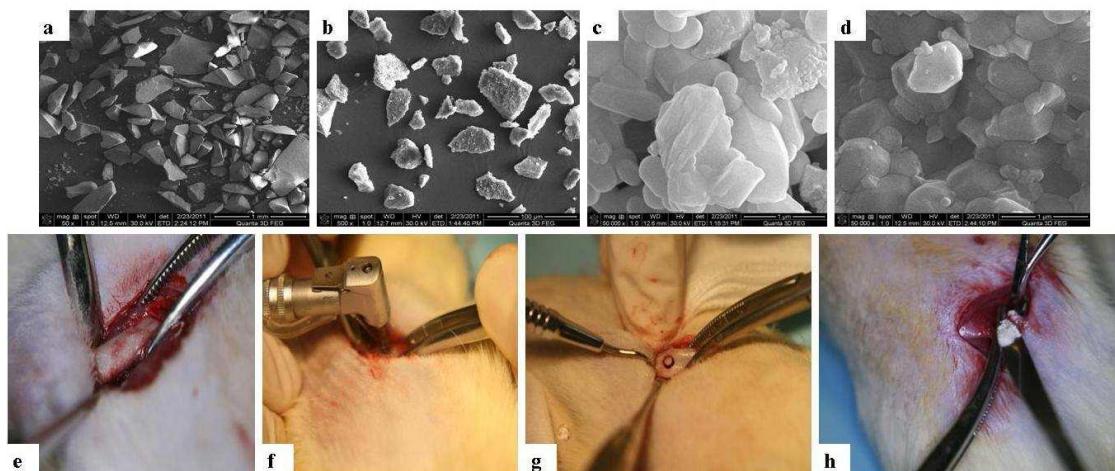


Fig. 8 Forma granulara, neregulata a ceramicelor cu compozitia 90% Al_2O_3 -10% ZrO_2 (a) si 90% Al_2O_3 -10% ZrO_2 +5% TiO_2 (b), microstructura corespunzatoare (c, d) si procedura chirurgicala de impantare in defectul osos creat cu ajutorul unei freze trephine (e, h).

Au fost realizate radiografii ale femurului la diferite interval de timp, pentru a verifica integrarea materialului in tesut. Animalele au fost eutanasiate la diferite intervale de timp (3, 6 saptamani), iar tesutul osos si cel conjunctiv adiacent au fost analizate histologic. In figura 9 sunt prezentate radiografiile femurului de sobolan Wistar dupa 3 respectiv 6 saptamani de la procedura chirurgicala (a,b), dar si un caz de fractura care a aparut in acest interval de timp (c).



Fig. 9. Monitorizarea procesului de oseointegrare a materialului ceramic la diferite interval de timp: a) 3 sapt; b) 6 sapt; c) un caz de fractura.

Pentru a obtine mai multe detalii referitoare la procesul de oseointegrare, dupa eutanasiere, zona care contine implantul a fost analizata prin SEM, obtinandu-se imagini de suprafata a tesutului osos la diferite interval de timp (fig. 10). Concomitent a fost realizata si analiza EDX a tesutului osos, pentru a evidenta din punct de vedere cantitativ compozitia noului os format. Dupa cum se observa in fig.10, ceramicile de forma granulara implantate in defectul de mica dimensiune practicat in femurul de sobolan, s-au integrat foarte bine in tesutul osos, iar dupa 6 saptamani defectul a fost complet acoperit cu tesut osos nou. Imaginele SEM arata si formarea unei matrice colagenice tridimensionale cu pori interconectati, chiar dupa primele trei saptamani, cu toate ca unele regiuni au ramas inca neacoperite. La finalul celor 6 saptamani, matricea din zona defectului se prezinta sub forma densa si mineralizata. Acest lucru este demonstrat si prin analiza cantitativa EDAX, care evidențiaza un raport Ca/P cu valori cuprinse intre 1.6 si 1.72 dupa 6 saptamani de la implantare. Aceasta valoare este considerata un indicator important al osteointegrarii, avand in vedere ca pentru apatita pură Ca/P= 1.67 in cazul ideal. Rezultatele au fost similare pentru toate probele investigate. Examenul histologic al tesutului conjunctiv a demonstrat absenta oricarui raspuns immunologic sau inflamator in zona adiacenta defectului, fara necroza sau modificari care sa sugereze rejectarea materialului, asa dupa cum se poate observa in fig.11. Arhitectura noului os are structura trabeculara cu infiltrari celulare, iar zona periostala si cea endostala sunt complet acoperite. Astfel este realizata osteointegrarea, prin

contactul direct dintre suprafața implantului și noul tesut, fără interpunerea unui alt tip de tesut conjunctiv [8].

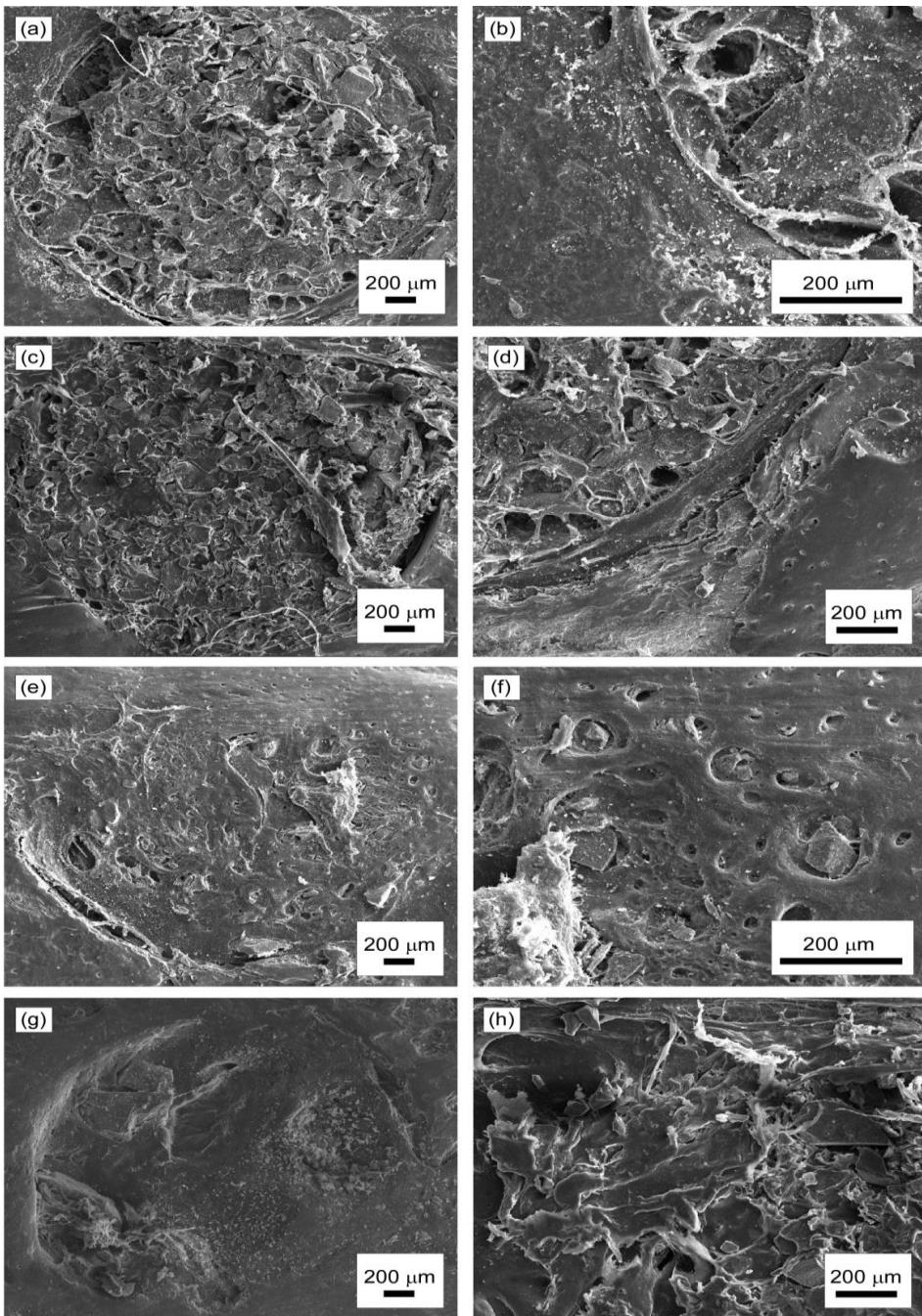


Fig. 10. Imagini de microscopie SEM înregistrate în zona defectului osos la diferite intervale de timp după procedura chirurgicală. Defectul completat cu compozitia $90\% \text{Al}_2\text{O}_3\text{-}10\%\text{ZrO}_2\text{+}5\%\text{TiO}_2$ (a,c,e,g), respectiv $90\% \text{Al}_2\text{O}_3\text{-}10\%\text{ZrO}_2$ (b,d,f,h), model animal mic (Wistar).

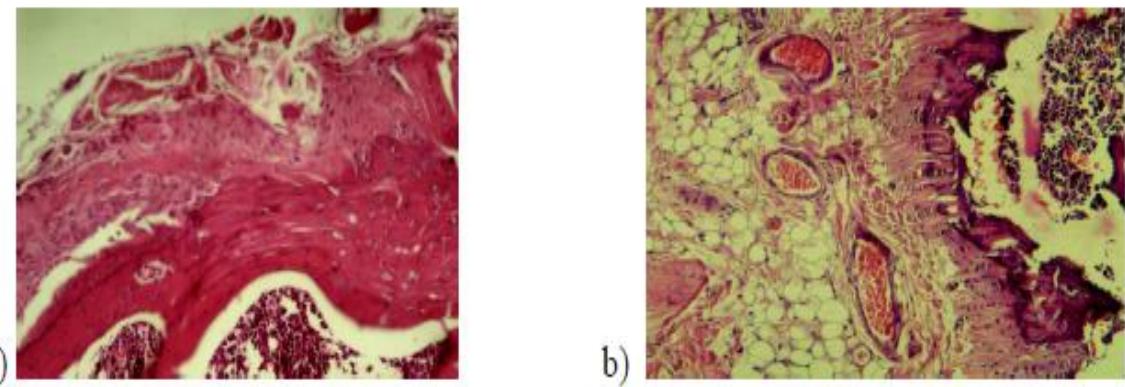


Fig. 11 Imagini histologice ale tesutului conjunctiv in contact cu defectul osos si materialul ceramic implantat in femurul de sobolan Wistar. a) 90% Al_2O_3 -10% ZrO_2 +5% TiO_2 si b) 90% Al_2O_3 -10% ZrO_2 .

Teste in vivo-model animal iepure.

Avantajul acestui model fata de Wistar este faptul ca permite crearea unor defecte osoase de dimensiuni relative mari, in care pot fi adaptate implanturi de diferite forme, corespunzator obiectivelor urmarite. Pentru acest model noi am confectionat piese ceramice de forma conica cu dimensiunile H=8 mm, D=3mm, d=2mm, care au fost tratate chimic cu floruri SnF_2 respectiv $NaBF_4$. Se cunoaste faptul ca atat forma (design-ul) cat si dimensiunile unui implant sunt factori care trebuie luati in seama in cazul unui model animal, deoarece dupa sacrificare, analizele ex-vivo includ atat analiza tesutului adiacent cat si a suprafetei implantului extras. Testele de tip "pull-out" sau "push-out" pot afecta tesutul de investigat, deci procedura de inlaturare a implantului ex-vivo trebuie sa tina cont de geometria implantului [8,9]. In fig. 12 sunt prezentate cateva aspecte ale procedurii chirurgicale realizate de echipa noastra pe un lot de 10 iepuri.



Fig. 12. Aspecte ale procedurilor chirurgicale realizate in cadrul modelului animal iepure. Se remarcă posibilitatea de creare a unui defect de dimensiuni relativ mari, in care să poată fi adaptat implantul confectionat din ceramica alumina/zirconium.

Examenul radiologic efectuat după 2 respectiv 6 săptămâni a demonstrat în toate cazurile (n=10) o bună integrare a implantului în femurul de iepure, precum și refacerea tesutului osos, care a acoperit uniform zona defectului creat (fig. 13).



Fig. 13 Imaginea radiografica a femurului după 2 săptămâni de la inserție; se poate observa stabilitatea și buna integrarea a piesei ceramice în structura femurului (stanga). Fotografie a femurului realizată după sacrificarea animalului (6 săptămâni) care demonstrează acoperirea completă a defectului cu tesut osos tanar, după 6 săptămâni de la inserare (dreapta).

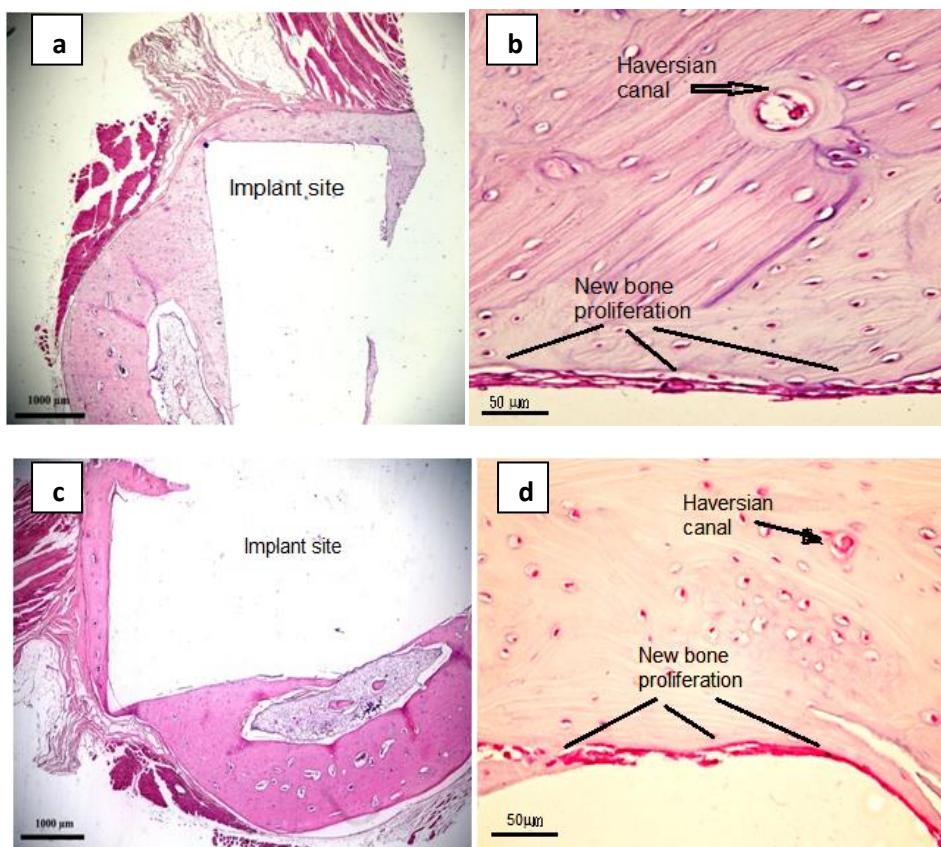


Fig.14 Imagini histologice ale tesutului osos în care a fost inserat implantul ceramic (a,b) tratat cu SnF_2 respectiv NaBF_4 (c,d).

In cadrul acestui model s-a folosit tehnica histologica clasica de colorare H&E pentru a evidenta morfologia tesutui osos in contact cu implantul. Dupa cum se observa in fig. 14, in urma desprinderii implantului din defectul care a fost creat dupa dimensiunile exacte a piesei, tesutul pastreaza forma exacta a piesei implantate. Noul os a proliferat pe toate fetele implantului. Detaliile microscopice evidentaaza osteoblastele si canalele Haversiene, ca o dovada a bunei vascularizari in zona de contact. Nu s-au remarcat reactii de corp strain la interfata implant-tesut gazda pentru nicio piesa implantata. Prin compararea rezultatelor si estimarea zonei de contact os-implant, putem afirma faptul ca acest model s-a dovedit superior modelului Wistar. Un alt rezultat il reprezinta faptul ca tratamentul cu SnF₂ al suprafetelor ceramice favorizeaza o mai buna integrare a implantului.

Etapa V

In aceasta etapa au fost efectuate teste complementare *in vivo/in vitro* in scopul determinarii componzitiei optime a bioceramicelor tinand cont de rezultatele precedente, obtinute in etapele anterioare. Au fost comparate imaginile microscopice de fluorescenta obtinute in urma testelor *in vitro*, in culturi de celule (fibroblaste) aderente pe suprafata diferitelor specimene ceramice. De asemenea au fost analizate prin microscopie electronica SEM/EDAX esantioanele de tesut osos obtinute dupa indepartarea pieselor ceramice cu care au fost in contact.

Elaborarea unor noi modele animale in scopul optimizarii interfetelor dintre osul natural si implant este o munca de durata care necesita studii complementare de structura chimica, duritate, rezistenta la fractura, stabilitate mecanica si chimica, siguranta. Astfel, noile biomateriale trebuie sa fie supuse unor teste complementare *in vitro* si *in vivo*. Testele *in vitro* se practica intr-o prima faza, in scopul evaluarii citotoxicitatii/ citocompatibilitatii tocmai pentru a evita sacrificiul unui numar mare de animale. Testele *in vitro* se limiteaza adesea la supravietuirea celulara si cel mult la proliferarea si diferențierea lor, fiind foarte utile in cazul unui screening al noilor materiale care au incorporate aditivi cu potential efect daunator (de exemplu diferiti oxizi sau ioni metalici). Datorita timpului relativ scurt in care se petrec testele *in vitro*, ele sunt relevante mai mult in cazul unor efecte acute de toxicitate, limitarea majora fiind legata de lipsa controlului conditiilor fiziologice de efort al osului, care poate fi evaluat corect numai ex-vivo. Din acest motiv, modelele animale permit o evaluare a biomaterialelor pentru implanturi atat in conditii de efort (tensiune), cat si de repaos, pentru o perioada indelungata, tinand cont si de varsta si

calitatea tesutului (de exemplu os tanar sau os matur, osteoporoza). Astfel poate fi studiat tesutul nu numai in imediata vecinata a implantului, dar si la diferite distante fata de locul defectului creat. De aceea, modelul animal permite o evaluare a conditiilor mecanice si fiziologice asemanatoare cu situatiile clinice. Totusi, un model animal este doar o aproximare, fiecare model avand avantaje si dezavantaje. In primul rand, pentru testarea implanturilor ortopedice si dentare modelul trebuie sa tina cont de dimensiuni, deoarece numarul si marimea implanturilor inserate vor influenta direct procesele de regenerare tisulara. S-a constatat ca folosirea modelului animal iepure in comparatie cu sobolanii Wistar prezinta unele avantaje: pot fi utilizate implanturi de forma cilindrica cu dimensiuni mai mari, de exemplu diametru 2-3 mm si lungime 6-7 mm si permite utilizarea multiplelor piese concomitent (6 piese implantate/animal conform standardelor ISO 10993-6, 1994). Din punct de vedere histologic, exista o diferență semnificativă între microstructura osului lung uman și cel de iepure, acesta din urmă având o vascularizare primară longitudinală, formată din canale vasculare și osteoni orientați paralel cu axul longitudinal, înconjurând canalul medular și suprafața periostala. Între aceste straturi există os dens, iar diametrul mediu al unui osteon este apoximativ 55 µm. Se pare că există totuși asemănări în ce privește compozitia și densitatea minerală a osului uman și cel de iepure, astfel încât teste de rezistență la fractură sunt un indiciu valoros. De asemenea, în comparație cu alte specii, iepurele are o rată de remodelare ("turnover") mai rapidă, în special intracortical [8,9].

Utilizând modelul animal iepure au fost investigate implanturi confectionate în forma de trunchi de con și disc, utilizând diferite compozitii: 80%Al₂O₃-20ZrO₂, 80%Al₂O₃-20ZrO₂+3%TiO₂, 90%Al₂O₃-10ZrO₂, 90%Al₂O₃-10ZrO₂+3%TiO₂. Câteva imagini ale analizei histopatologice și inserarea unui implant conic în femurul de iepure sunt prezentate în fig.15. Imaginele arată că, după detasarea implantului, tesutul a pastrat perfect forma geometrică a acestuia, deci implantul a fost tot timpul în contact cu tesutul osos. De asemenea, după sase săptămâni, nou os a proliferat astfel că a acoperit perfect orificiul creat initial, fiind bine vascularizat de jur imprejurul implantului. Detaliile și arhitectura noului os proliferat se pot observa în fig.16, colorarea fiind realizată cu tehnica Goldner's Tricrome. Se mai observă faptul că tolerabilitatea este foarte bună, nu au avut loc fenomene inflamatorii, sau respingere creata de sensația de corp strain. Pentru toate specimenele testate s-a remarcat un proces reparator de jur imprejurul implantului. După detasarea implantului, tesutul osos a fost analizat și cu ajutorul microscopiei electronice SEM, evidențiindu-se totodata și analiza cantitativa prin EDAX. În fig. 17 (a-c) se

pot obseva detaliile de microscopie electronica a noului os format in zona de contact cu tesutul conjunctiv, dar si in sectiune transversala, dupa detasarea implantului. Fig. 17b prezinta structura unui canal Haversian, ca o dovada a bunei vascularizari a noului os, iar fig. 17c demonstreaza arhitectura lamelara a noului os in contact cu implantul, dupa 6 saptamani. Spectrele EDAX, in ambele situatii, confirmă calitatea noului os format. Analiza cantitativa a osului indica un raport Ca/P de 1.72 respectiv 1.77, valori care sunt in limitele normale si corespund cu alte date din literatura [10].

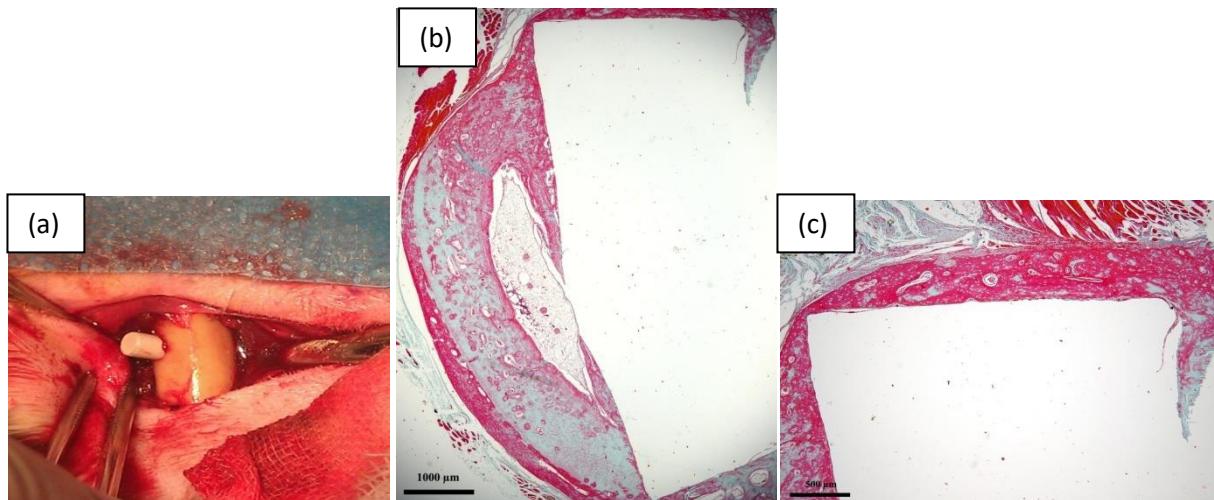


Fig. 16 a) Inserarea implantului de forma tronconica in femurul de iepure; b) Interfata implant-tesut osos la 6 saptamani de la implantare c) Detaliu al interfetei cu evidențierea zonei de formare a noului os.

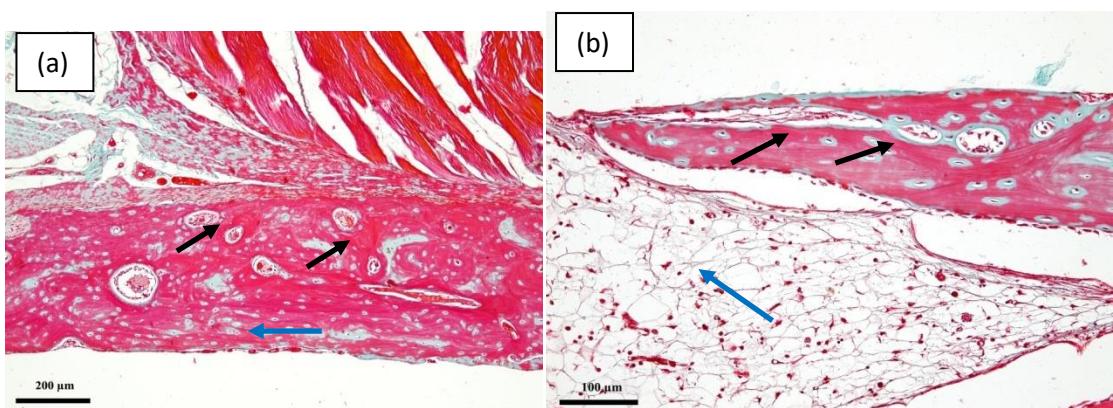


Fig. 17 Detalii histologice ale noului os format la interfata cu implantul; a) Sageata neagra-osteon tanar, sageata albastra-os primar. b) Sageata neagra-trabecula osoasa, sageata albastra-maduva osoasa.

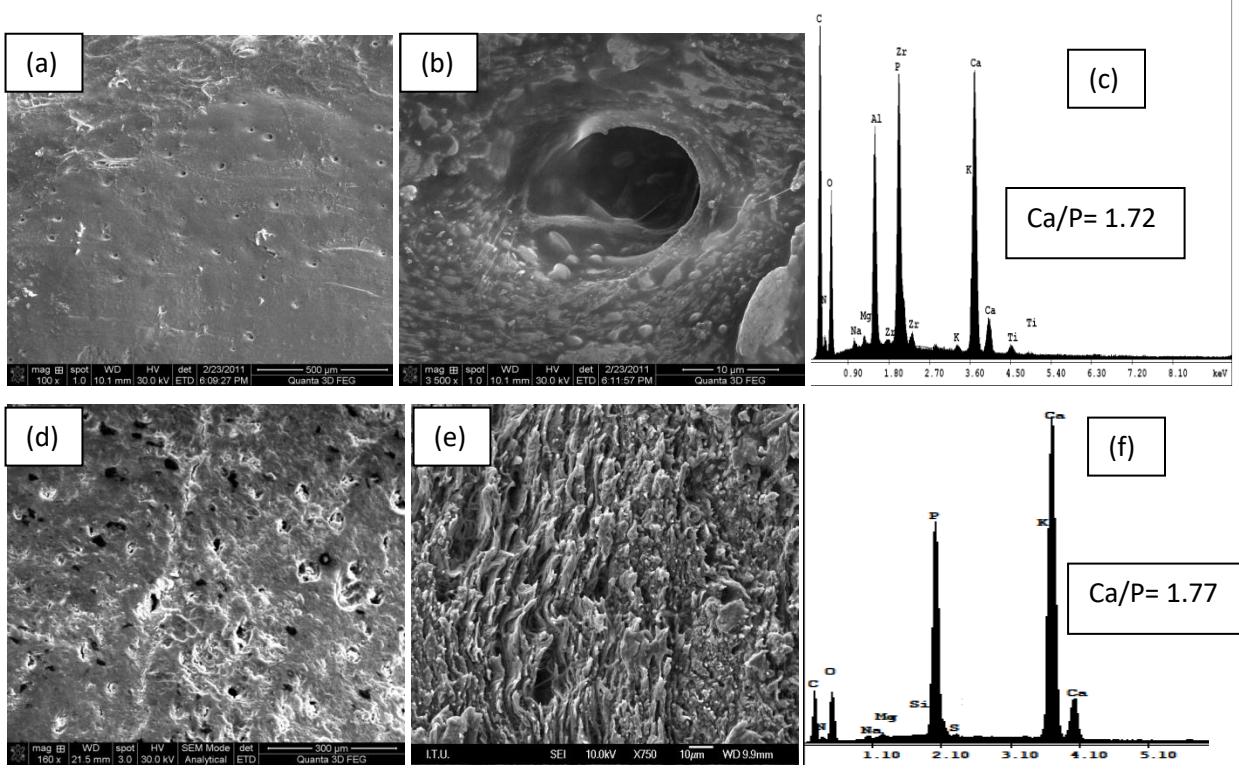


Fig. 18. Imagini de microscopie electronică SEM înregistrate la suprafața nouului os precum și spectrele EDX corespunzătoare: (a-c) aria de formare a nouului os-suprafața de contact cu tesutul conjuncțiv, (d-f) interfața implant-os în secțiune transversală.

Inainte de sacrificare, examenul radiologic a confirmat în sute din cele opt cazuri o buna integrare a implantului, o buna stabilitate si lipsa oricarei inflamatii sau a tesutului fibros. Un singur caz a prezentat complicatii post-operatorii si nu a supravietuit investigatiei. Dupa explantarea pieselor, acestea nu au prezentat semne de deteriorare chimica sau mecanica. In urma analizei de difractie XRD efectuata comparativ (fig. 19), se pot observa markerii corespondatori hidroxiapatitei la $2\theta^{\circ}=31.8^{\circ}$ si 39.7° indicand faptul ca noul os a acoperit uniform suprafața defectului in care a fost inserat implantul, deoarece aceste benzi caracteristice sunt vizibile si impreuna cu cele caracteristice compozitiei ceramice (respectiv alumina si zirconium) care au fost inregistrate ca si martor, inainte de implantare [11,12].

In paralel cu testeile *in vivo*, au fost efectuate si teste *in vitro*, utilizand culturi celulare (fibroblaste). Fibroblastele umane (HFL-1) au fost menintute in mediu de cultura continand 4.5 g/L glucoza, nutrient Ham's F12 suplimentat cu 10% bovina serica fetala , 2 mM glutamina, 1% penicilina/streptomicina, 1% aminoacizi, la 37°C , in atmosfera 5% CO_2 , 95% umiditate relativa. Suprafata specimenelor (sterile) a fost acoperita in prealabil cu Poly-L-Lysine (Sigma, P4707) si

apoi spalate cu tampon fosfat (PBS). O cantitate mica ($50 \mu\text{L}$) continand $5 * 10^4$ celule in mediu de cultura a fost adaugata pe suprafata specimenele ceramice si lasate sa adere timp de 3 ore. Fixarea celulelor a fost facuta dupa 3, 7 si 24 h cu paraformaldehida (4%) timp de 15 min la temperatura camerei. Inainte de a fi analizate prin microscopie SEM si microscopie de fluorescenta, specimenele au fost din nou spalate cu PBS. Nucleele au fost marcate cu 5 mM Draq5 in solutie diluata 1:1000 in apa distilata, timp de 5 min, la temperatura camerei [11].

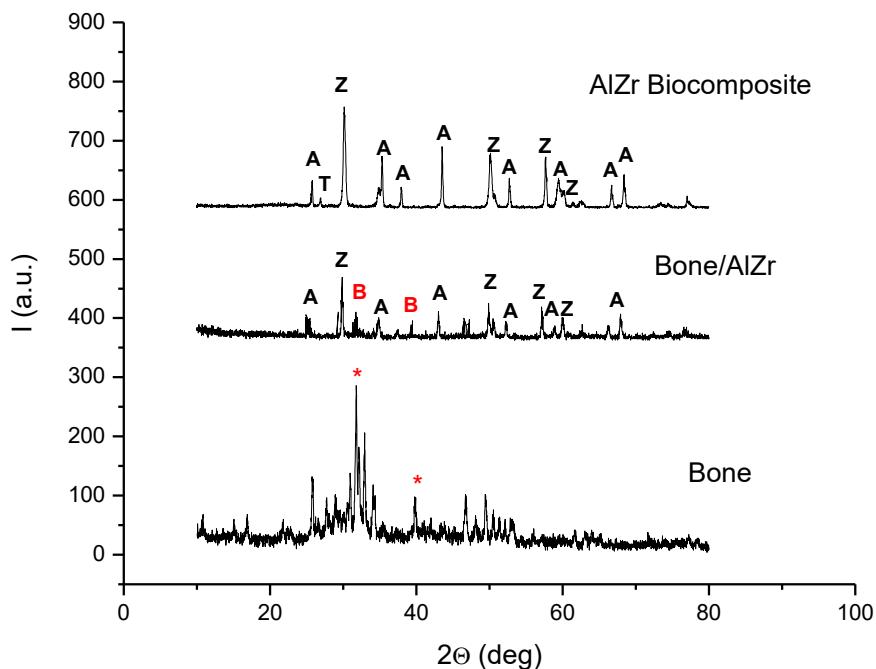


Fig. 19 Spectrul de difracție al razelor X (XRD pattern) înregistrat pentru femurul de iepure la 6 săptămâni după inserția implantului, comparație între spectrul osului neafectat de inserție (jos), aria osului care conține implantul (mijloc) și spectrul implantului Al/Zr înainte de inserție (sus).

Dupa diferite intervale de timp, imaginile de fluorescenta arata viabilitatea celulelor, asa dupa cum este exemplificat in fig.20 pentru specimenele ceramice cu compozitia $80\% \text{Al}_2\text{O}_3-20\%\text{ZrO}_2$ respectiv $80\% \text{Al}_2\text{O}_3-20\%\text{ZrO}_2+3\%\text{TiO}_2$. Imaginile dovedesc o evolutie a proliferarii si colonizarii celulare, acest proces fiind mai intens pentru specimenele care contin TiO_2 . Pentru a studia morfologia celulelor, gradul de proliferare, orientarea si detaliile atasarii lor de fiecare specimen, au fost inregistrate imaginile de microscopie electronica SEM, care sunt prezentate in fig. 21

(exemplificare pentru cele două specimene prezентate anterior). Se observă că într-o prima fază, după 3h, celulele nu proliferă pe suprafață, evită chiar contactul cu suprafață, au formă sferică (primul specimen). Cel de-al doilea specimen prezintă o mai bună condiție pentru aderarea celulelor, ele adoptând o formă plată. După 7h, celulele prezintă numeroase filopode atașate pe suprafață, încep chiar să intre în contact unele cu altele. Contactul dintre celule sugerează formarea unor posibile agregate, care de altfel sunt vizibile și în imaginile de fluorescentă. După 24h, morfologia celulelor indică formarea unei suprafețe tip carapace, care acoperă o mare parte din suprafață ceramică. Această suprafață pare mai densă și mai uniformă în cazul specimului cu compozitie 80% Al₂O₃-20ZrO₂+3% TiO₂, pastrându-se un contact mai bun între celule, și având o mai bună capacitate de aderare. Detaliile de microscopie electronică prezентate în fig. 21-23 arată că ambele specimene prezintă, de fapt, o suprafață compatibilă, fără efecte negative asupra proliferării fibroblastelor.

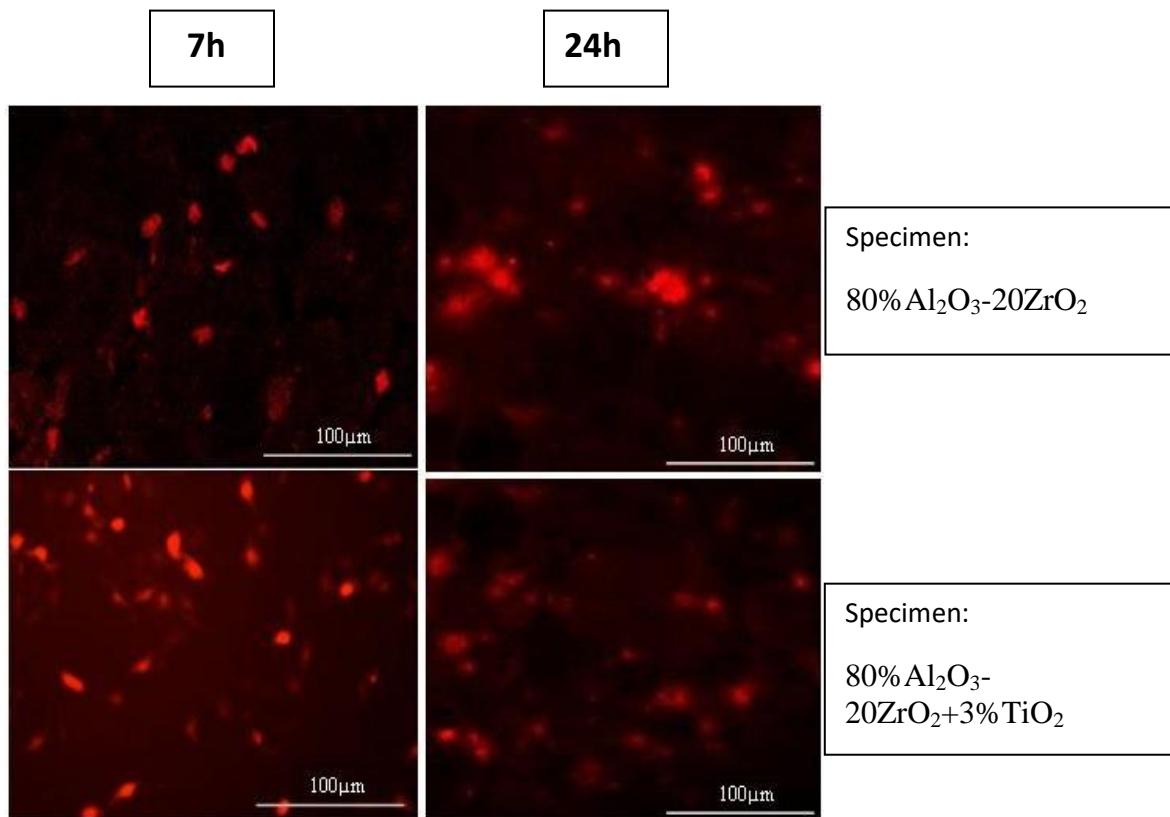


Fig. 20 Imagini de fluorescentă a celulelor viabile atașate de diferite specimene ceramice, după 7 respectiv 24h.

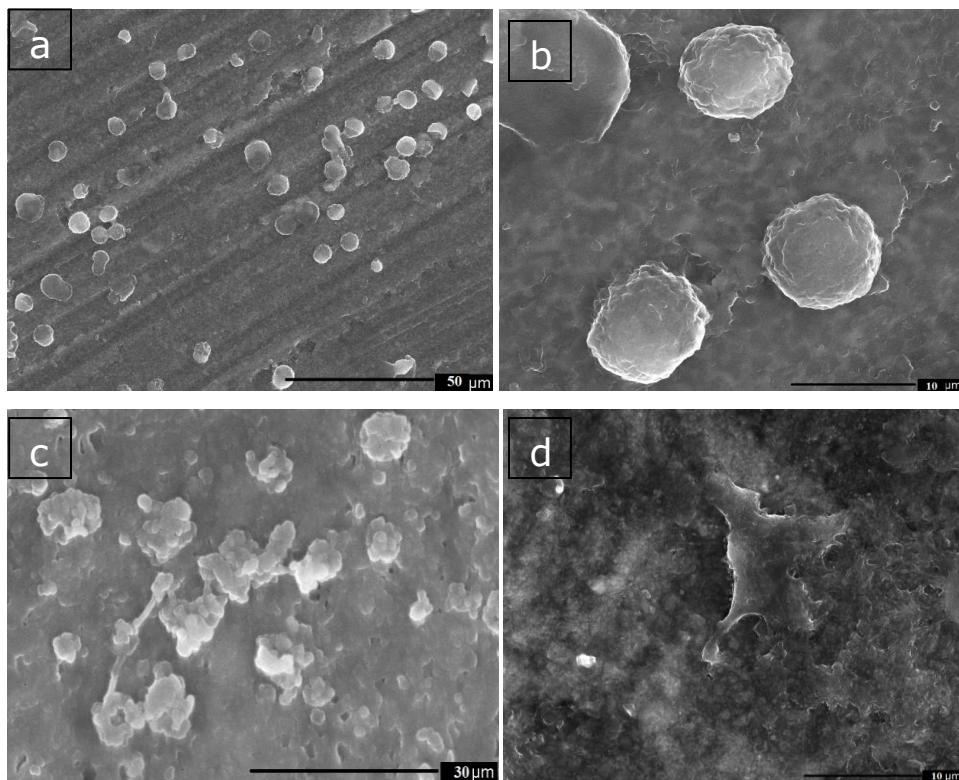


Fig. 21 Morfologia celulelor fibroblaste in contact cu suprafetele ceramice 80% Al_2O_3 -20% ZrO_2 (a,b) respectiv 80% Al_2O_3 -20% ZrO_2 +3% TiO_2 (c,d) in prima fază de aderare (după 3h)

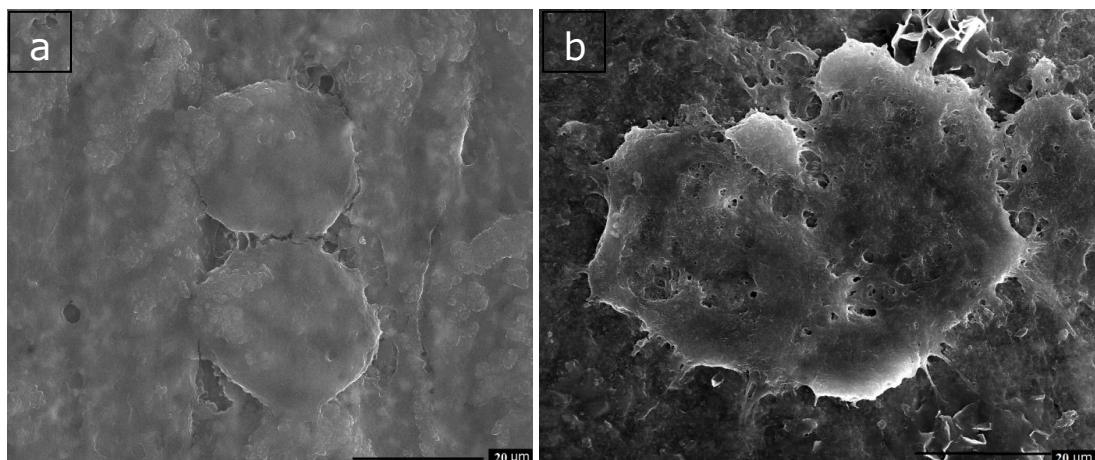


Fig. 22 Morfologia celulelor fibroblaste in contact cu suprafetele ceramice 80% Al_2O_3 -20% ZrO_2 (a) respectiv 80% Al_2O_3 -20% ZrO_2 +3% TiO_2 (b) după 7h

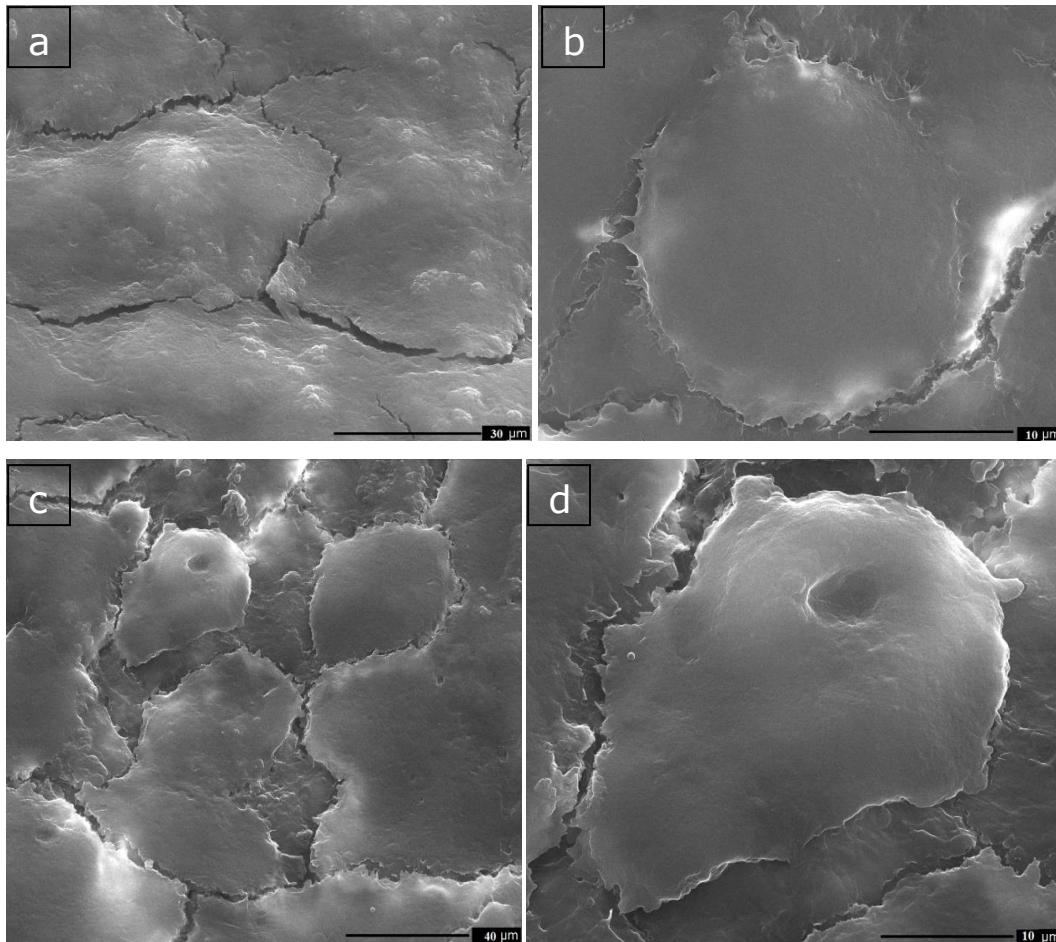


Fig. 23 Morfologia celulelor fibroblaste in contact cu suprafetele ceramice 80% Al_2O_3 -20 ZrO_2 + TiO_2 (a,b) respectiv 80% Al_2O_3 -20 ZrO_2 (c,d) dupa 24h.

Prin corelarea rezultatelor obtinute in aceasta etapa, s-a putut afirma ca suprafetele ceramice cu compozitia 80% Al_2O_3 -20 ZrO_2 + TiO_2 prezinta o capacitate mai buna de aderare si proliferare a fibroblastelor comparativ cu celelalte specimene. De asemenea, modelul animal iepure este cel mai adevarat pentru studiul *in vivo*, geometria implanturilor fiind un factor foarte important in acest caz. Forma tronconica pare sa fie cea mai favorabila geometrie, iar rezultatele testelor *in vivo* au fost in concordanta cu cele *in vitro*.

Etapa VI

Pentru a stabili compozitia optima a bioceramicelor investigate, au fost efectuate cateva teste complementare *in vitro*, in raport cu proprietatile de aderare a unor nanoparticule organice, proteice. Cunoasterea proprietatilor de suprafata, in urma contactului cu materia organica sub forma de nanoparticule permite o evaluare mult mai ampla a noilor bioceramici, care au ele

insele un aspect nanostructurat (fig. 3). Nanoparticulele de fibrinogen au fost preparate dupa un protocol bine stabilit [13] utilizand clorura de calciu ca si agent de cross-linking. Se cunoaste faptul ca fibrinogenul este o proteina implicata in fenomene de coagulare in cascada, iar afinitatea/depunerea ei pe suprafetele anorganice ale implanturilor are o puternica influenta in biodistributia si orientarea celulelor noului tesut in contact cu implantul. Literatura de specialitate prezinta cateva tipuri de materiale organice utilizate drept “coating” care au un efect modulator specific in raport cu raspunsul biologic: protein (fibrinogen, albumina, collagen), AND, zaharuri, etc. Astfel, “coating-ul” mascheaza implantul anorganic astfel incat sa nu fie percepuit ca si un corp stain, si apoi rejectat de tesutul gazda. Pentru acrste teste s-au pregatit ceramic cu componetie diferita, in forma cilindrica/discuri (fig. 24a) pe care s-a depus un strat de fibrinogen (nanoparticule). Suprafetele au fost investigate prin microscopie electronica si ATR-FTIR pentru a evalua atat morfologia stratului proteic (ultrastructura, grosimea) dar si calitatea si modificarile structurale ale proteinei in contact cu bioceramicile.

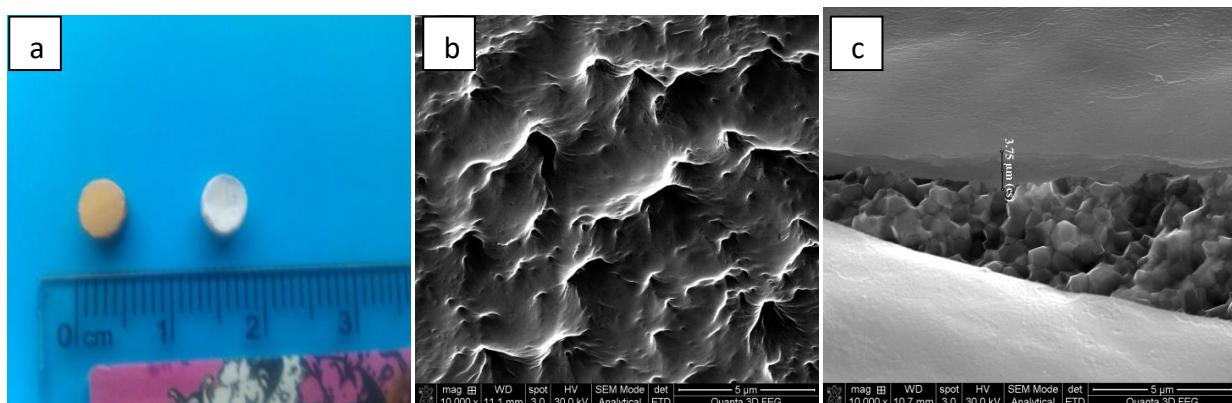


Fig. 24 a) Imaginea macroscopică a pieselor cilindrice (discuri); Imagini SEM ale suprafetei ceramice după depunerea stratului de fibrinogen; c) detalii ale stratului de fibrinogen care a fost desprins intentionat de pe suprafata ceramica pentru a se masura grosimea.

Fig. 24b prezinta imaginea de microscopie electronica a stratului de fibrinogen in contact cu suprafata discului ceramic, detaliile demonstreaza o suprafata nanostructurata. Dupa detasarea stratului, s-a putut masura grosimea ”in situ” ca fiind $3.7 \mu\text{m}$, uniform pe toata suprafata (fig. 24c). O alta dovada a faptului ca stratul s-a depus uniform pe suprafata ceramica o reprezinta analiza spectrelor ATR-FTIR pe suprafete, analiza care a demonstrat si faptul ca proteina nu a suferit nicio denaturare in contact cu materialul ceramic (fig. 25). Spectrele ATR FTIR inregistrate pe suprafata diferitelor specimen, dupa depunerea stratului de fibrinogen, prezinta

caracteristicile structurale ale fibrinogenului: 3317 cm⁻¹ (amide A), 1650 cm⁻¹ (amide I), 1554 cm⁻¹ (amide II) si 1240 cm⁻¹ (amide III) [13,14].

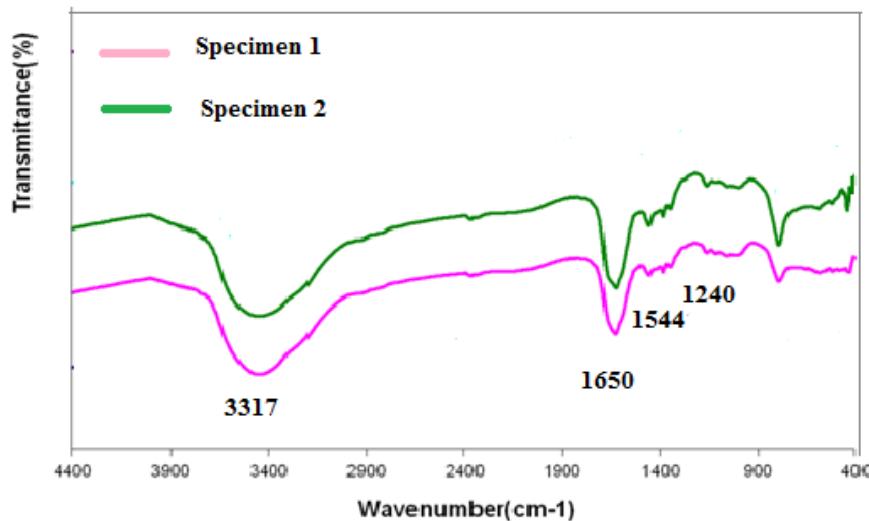


Fig. 25 Spectrele ATR- FTIR inregistrate pe suprafata unor specimene ceramice dupa depunerea stratului de fibrinogen.

Rezultatele obtinute in urma testelor *in vitro* si *in vivo* au fost corelate cu cele obtinute din analiza structurala a specimenelor avand un continut variabil de alumina/zirconiu, iar concluziile finale sunt urmatoarele:

1. Tehnica de sinterizare in plasma (SPS) permite obtinerea unor materiale ceramice cu proprietati structurale, mecanice si o biocompatibilitate superioara celor obtinute prin sinterizarea clasica.
2. Analiza structurala/ultrastructurala a compozitelor de alumina/zirconiu a demonstrat o densificare de pana la 99.7%, fapt care le confera proprietati mecanice speciale. Testele mecanice au demonstrat faptul ca adaosul de zirconat in proportie de 20% in matricea de aluminiu duce la o crestere a rezistentei la fractura.
3. Modificarile de suprafata a unor specimene cu componitie variabila, in urma tratarii cu SnF₂ si NaBF₄ au demonstrat faptul ca tratamentul cu SnF₂ este mai eficient in raport cu toate compozitiile investigate. Testele *in vitro* utilizand culturi celulare (fibroblaste) au

sustinut aceste rezultate, demonstrand o mai buna aderare si proliferare pe suprafetele tratate cu SnF2.

4. Teste in vivo care au utilizat doua modele animale (Sobolan Wistar si iepure) au demonstrat faptul ca ceramicele propuse sunt biocompatibile cu tesutul osos; mai mult, modelul animal iepure a demonstrat faptul ca ceramicile pot fi manufacture in forma de trunchi de con (cea mai favorabila geometrie), care se adapteaza perfect in femur. Specimenele cu compozitia $80\%Al_2O_3-20ZrO_2+3\%TiO_2$ au prezentat cele mai bune rezultate conform modelului animal iepure, in urma analizei histologice a tesutului osos si a tesutului conjunctiv adjacent.
5. Testele complementare in vitro, in urma depunerii unui strat de fibrinogen (nanoparticule) au confirmat faptul ca compozitia $80\%Al_2O_3-20ZrO_2+3\%TiO_2$ este cea mai favorabila, fapt care a fost evidentiat atat prin analizele structurale/mecanice, cat si testele de biocompatibilitate.

Bibliografie

- [1] J. Charnley, Surgery of the hip joint, Br Med J (1960):821–826.
- [2] A.H. De Aza, J. Chevalier, G. Fantozzi, M. Schehl, R. Torrecillas, Crack growth resistance of alumina, zirconia and zirconia toughened alumina ceramics for joint prostheses, Biomaterials 23 (2002) 937–945.
- [3] R. Heros, G. Willmann, Ceramics in total hip arthroplasty: history, mechanical properties, clinical results and current manufacturing state of the art, Semin. Arthroplast. 9 (1998) 114–122.
- [4] K. Duan and R. Wang, “Surface Modifications of Bone Implants Through Wet Chemistry,” J. Mater. Chem., 16 (206) 2309–2321.
- [5] N. R. F. A. Silva, et al., Performance of Zirconia for Dental Healthcare, Materials, 3 (2010) 863–896.
- [6] F. Hattab, The State of Fluorides in Toothpastes, J. Dent., 17(1989), 47-54.
- [7] T. Mosmann , Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol Methods 65: 55- 63 (1983).
- [8] A. Pierce, R.G. Richards, S. Milz, E. Schneider, S.G. Pierce, *Animal* model for implant biomaterial research in bone, European Cells and Materials 13 (2007), 1-10.
- [9] C.M. Davies, D.B. Jones, M.J. Stoddart, K. Koller, E. Smith, C.W. Archer, R.G.Richards, Mechanically loaded ex vivo bone culture systems, Eur Cell Mater 11 (2006) 57-75.

- [10] M. Tzaphlidou, R. Speller, G. Royle, J. Griffiths, Preliminary estimates of the Ca/P ratio at different cortical bone sites, *Physics in Medicine and Biology* (2006) 51(7):1849.
- [11] J.S. Osborn, H. Newesly, Dynamic aspects of the implant-bone interface, In: Heimke G. (ed), *Dental Implants: Materials and Systems*, Carl Hanser Verlag, Munich, Germany, 1980, 111–23.
- [12] C. Wu, Y. Xiao, Evaluation of the In vitro bioactivity of bioceramics, *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 2 (2009) 25-29.
- [13] K. Duan, R. Wang, Surface modifications of bone implants through wet chemistry, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 2309-232.
- [14] R. Jimbo, M. Ivarsson, A. Koskela, Y. -T. Sul, C. B. Johansson, Protein adsorption to surface chemistry and crystal structure modification of titanium surfaces, *J. Oral Maxillofac. Res.* 1/3 (2010) 1-9.

Diseminarea rezultatelor

Articole in Reviste de specialitate cotate ISI, cu factor de impact:

- [1] **Simona Cavalu**, V. Simon, F. Banica, I. Akin, G. Goller, Surface modification of alumina/zirconia bioceramics upon different fluoride-based treatments, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, 11 [2] (2014) 402–411.
- [2] O. Ormanci, I. Akin, F. Sahin, O. Yucel, V. Simon, **Simona Cavalu**, G. Goller, Spark Plasma sintered A_2O_3 -YSZ-TiO₂ composites: Processing, characterization and in vivo evaluation, *Mater Sci Eng C*, 40 (2014) 16-23.
- [3] **Simona Cavalu**, V. Simon, I. Akin, G. Goller, Adherence properties of acrylic bone cement to alumina ceramics designed for clinical application, *Acta Physica Polonica A*, 2/125 (2014) 603-605.
- [4] **Simona Cavalu**, C. Ratiu, O. Ponta, V. Simon, D. Rugina, V. Miclaus, I. Akin, G. Goller, Improving osseointegration of alumina/zirconia ceramic implants by fluoride surface treatment, *Dig. J. Nanomaterials& Biostructures* 9/2 (2014) 797–808.
- [5] C. Ratiu, **S. Cavalu**, V. Miclaus, V. Rus, G. I. Lazarescu, Histological evidence of novel ceramic implant: evaluation of tolerability in rabbit femur, *Rom J Morphol Embryol* (2015) 56(4):1455–1460.
- [6] **S. Cavalu**, C. Ratiu, PMMA/Mg₃Al₂(SiO₄)₃ bone cements: production, structural characterization, bioactivity and biocompatibility evaluation, *Rom. J. Materials* (2016) submitted.

Articole in Proceeding ISI

- [1] Simona Cavalu, V. Simon, C. Ratiu, I. Oswald, R. Gabor, O. Ponta, I. Akin, G. Goller, Correlation between structural properties and in vivo biocompatibility of alumina/zirconia bioceramics, *Key Engineering Materials* vols. 493-494, 1-6, 2012.
- [2] Simona Cavalu, V. Simon, C. Ratiu, V. Rus, I. Akin, G. Goller, Titania versus ceria alumina zirconia composites: structural aspects and biological tolerance, *Key Engineering Materials* Vols. 529-530 (2013) 595-600.

- [3] Simona Cavalu, V. Simon, C. Ratiu, I. Oswald, S. Vlad, O. Ponta, Alternative Approaches Using Animal Model for Implant Biomaterials: Advantages and Disadvantages, Key Engineering Materials Vol. 583 (2014) 101-106.
- [4] C. Ratiu, S. Cavalu, V. Miclaus, C. Ober, I.Ratiu, O. Ponta, Grafting materials for major sinus lift, Key Engineering Materials vols. 493-494, 1-6, 2012, 609-614.
- [5] C. Ratiu, S. Cavalu, V. Miclaus, Autologous Bone vs. Allograft Bone in Ridge Augmentation, Key Engineering Materials Vols. 529-530 (2013) pp 270-274.
- [6] I. Oswald, Simona Cavalu, A. Bumbu, C. Brisc, S. Vlad, É. Todoruț , O. Pop, New Devices for Optimization of Renoureteral Lithiasis Treatment using ESWL, Key Engineering Materials Vol. 583 (2014) 155-159.
- [7] C. A. Ratiu, S. Cavalu, G. Lazarescu, A. Porumb, Immediate loading of dental implants, Key Engineering Materials, 695 (2016) 35-40.
- [8] C. A. Ratiu, S. Cavalu, Zirconia neck implants vs bone augmentation, Key Engineering Materials, 695 (2016) 31-34.
- [9] S. Cavalu, Acrylic bone cements: new insight and future perspective, Key Engineering Materials (2016) submitted.

Carti/volume colective:

- [1] **Bioceramics, Vol. 25**, I. Antoniac, Simona Cavalu, T. Traistaru (Eds), 2013, TRANS TECH PUBLICATIONS, Zurich, Elvetia. ISBN: 13 978-3-03785-899-8.
- [2] **Biomaterials and regenerative biomedicine**, I. Antoniac, S. Cavalu, S. I. Voicu (Eds) 2016, TRANS TECH PUBLICATIONS, Zurich, Elvetia. ISBN: 978-3-03835-567-0.

Intocmit de

Prof. dr. Habil. **Simona Cavalu**

Director de proiect