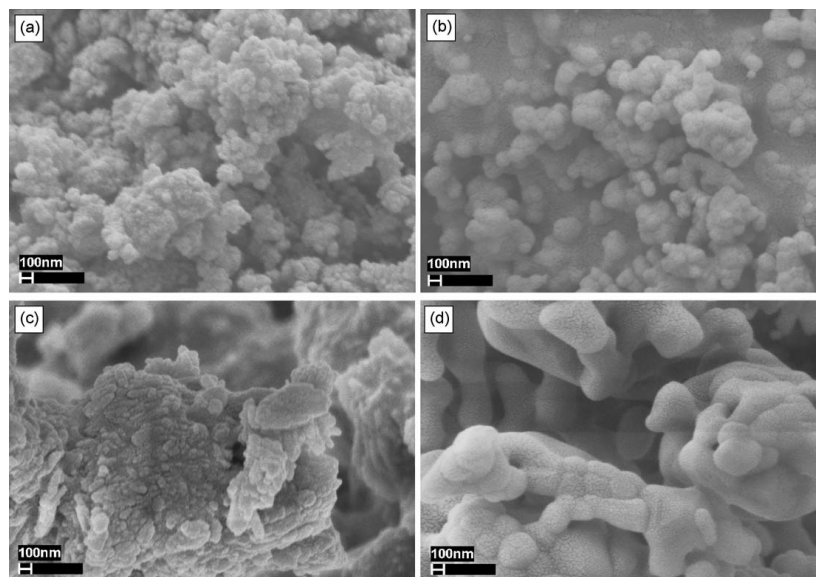


Zárójelentés

A 76181-es számú OTKA projekt keretében új szerkezetű bioaktív nanohidroxiapatit alapú biokerámiákat és hibridkompozitokat állítottunk elő. A nanohidroxiapatit porok és kompozitok előállításának technológiáját optimalizáltuk. Szerkezeti és morfológiai vizsgálatokat végeztünk, in-vitro és in-vivo tesztekkel bizonyítottuk a nanohidroxiapatit kiváló bioaktivitását és csontpótló implantátumként való alkalmasságát.

A nano-hidroxiapatit (nHA) porok szintézisét természetes alapanyagokból (tojáshéj és tengeri kagyló) kiindulva mechanokémiai módszerek segítségével végeztük. A porok szerkezeti és morfológiai jellegzeteségeit röntgendiffrakció (XRD), pásztázó elektronmikroszkópia (SEM) és infravörös spektroszkópia (FTIR) segítségével vizsgáltuk. Az XRD mérések azt mutatták, hogy adott kiindulási anyag (tojáshéj vagy kagylóhéj) és adott malom (bolygó vagy attritor) esetében nem tapasztalható eltérés a végtermék szerkezete és morfológiája között. Megállapítottuk, hogy az attritoros mintáknál már hőkezelés nélkül is kialakultak a nHA kristályok, míg a bolygómalmos mintánál ez a folyamat a 800°C-on kezelt mintánál kezdődik el. A hőkezeletlen bolygómalmos mintáknál a kalcium-hidroxid és kalcium-hidrogénfoszfát mellett a foszforsav kristályok találhatóak meg jelentős mennyiségben. 600°C-on az összes mintánál megfigyelhető az addig nem kimutatható kalcium-karbonát vonalainak az intenzitás növekedése.

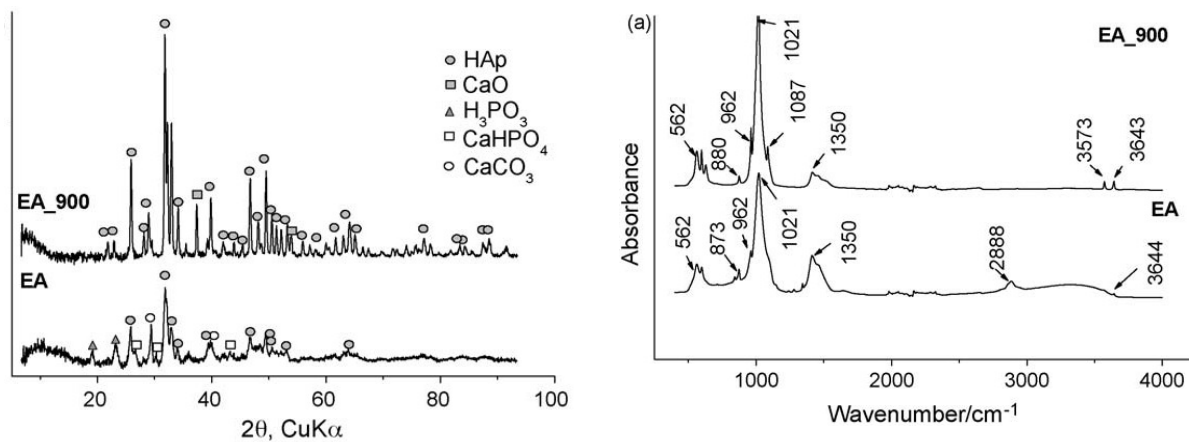


Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek: tojáshéjból készült nHA attritorozás (a) és hőkezelés után (b).

Tojáshéjból készült nHA bolygómalmozás (c) és hőkezelés után (d).

A bolygómalmos mintánál kalcium-oxid is kialakul, miközben az eddigi anyagok mennyisége csökken. 600°C fölött gyakorlatilag nincs krisztallográfiai különbség az adott módszerrel készült minták között, csak nHA-ból és trikálcium-foszfátból állnak, amelynek aránya a hőmérséklet növekedésével (900°C-ig) az nHA krisztályképződés felé tolódik el.

Az infravörös spektroszkópiai vizsgálatok is hasonló eredményeket mutattak. Már hőkezelés nélkül is kialakult a karbonátált hidroxipatit fázis. A karbonát CO_3 a PO_4 helyére szubsztituált (B-típusú karbonát, tetraéderes elhelyezkedésben). Kis mennyiségben jelen van még CaCO_3 és CaO is. Felületi $-\text{OH}$ is jelen van, valószínűleg a CaO -ra adszorbeál. A spektrumban még az alkohol sávjai is látszanak. Hevítve 600°C-on kialakul egy, a biológiai apatit-hoz hasonló fázis (gyengén krisztályos karbonátált nHA), majd tovább hevítve egy jól krisztályosodott nHA képződik. Hevítéssel a karbonát-tartalom csökken ugyan, de nem tűnik el teljesen (mint pl. a csont esetében), sőt - hevítés hatására - az nHA-ban az $-\text{OH}$ helyekre is szubsztituál a karbonát. Elmondható tehát, hogy a természetes csont anyagához nagymértékben hasonló karbonát gyököket is tartalmazó nHA-t sikerült létrehozni. Ez az anyag az EDS mérések alapján még magnézium nyomelemet is tartalmaz, amely segíthet az osteoporozítás (csontritkulás) megelőzésében.



Röntgendiffrakciós és infravörösspektroszkópia felvételek: tojáshejéből készült nHA attritorozás (EA) és hőkezelés után (EA_900).

A kalciumfoszfát alapú biokerámiák mellett, a hagyományosan magashőmérsékleti kerámiának tekintett, de az új irodalmi és klinikai vizsgálatok alapján potenciális implantátum anyagként is elfogadott szilíciumnitrid nanokompozitokat is bevontuk a kutatásba. Porózus és tömör szilíciumnitrid kerámiákat állítottunk elő különféle szinterelési technikákkal. A gáznyomású szinterelést (GPS, jellemző paraméterek: 1600-1700°C, 0-30 perc hőntartás, 1-20 bar nitrogen vagy argon gáznyomás,) és a meleg izosztikus préselést (HIP, jellemző paraméterek: 1700°C, 1-3 óra hőntartás, 200 bar nitrogen vagy argon gáznyomás) a Kerámia

és Nanokompozitok osztályán végeztük el (MTA-TTK-MFA). A porózus vagy teljesen tömör mikrostruktúra (porozitás, szerkezet, morfológia) kialakítását karbon hozzáadásával vagy a szinterelési paraméterek változtatásával végeztük el.

- GPS technológiával előállított porózus szilíciumnitrid néhány jellemzője:

0-11% nyílt porozitás egyidejű 0,9-2,5% zárt porozitás, alfa (és kevés béta) szilíciumnitrid, cirkóniumoxid szövetszerkezettel

- GPS technológiával előállított CNT-t tartalmazó kompozittelemek néhány jellemzője:

Látszólagos sűrűség: 1,9-3,17 g/cm³, valódi test sűrűség: 3,17-3,2 g/cm³, rugalmassági modulusz: 46-212 GPa, négy pontos szilárdság: 99-441 MPa, három pontos szilárdság: 120-606 MPa, alfa és béta szilíciumnitrid, cirkóniumoxid szövetszerkezettel.

- HIP technológiával előállított CNT-t tartalmazó kompozittelemek néhány jellemzője:

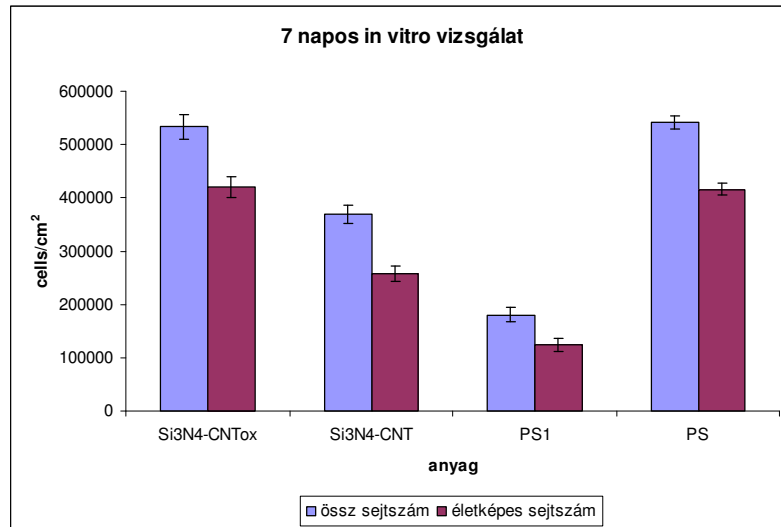
Látszólagos sűrűség: 1,8-3,32 g/cm³, valódi test sűrűség: 3,29-3,32 g/cm³, rugalmassági modulusz: 42-229 GPa, négy pontos szilárdság: 99-524 MPa, három pontos szilárdság: 110-716 MPa, béta szilíciumnitrid, cirkóniumoxid szövetszerkezettel.

A kerámiák és kompozitok előállításához szükséges porelőkészítési folyamatok, keverés, őrlés, szárítás, préseles szintén az MTA-TTK-MFA porelőkészítő laboraiban történt. Az előállítás során követtük a szerkezeti jellemzők (porozitás, kristályosodás, morfológia, összetétel) változásait. Röntgendiffrakció (XRD), pásztázóelektronmikroszkópia (SEM), transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), sűrűségmérés, mechanikai tesztek (modulusz, szilárdság, keménység) és elektromos vizsgálatok segítségével a kompozittelemek komplex jellemzését végeztük el.

Megállapítottuk, hogy a nagyhatékonyságú attritoros őrléssel készült porminták, a kezdeti 1 mikrométeres szemcsékből előállt 300 nm-es szemcsékkel jellemezhetők, és ez lényegesen meggyorsította a szinterelés közbeni alfa-béta fázisátalakulást. Feltártuk a karbon nanocsövel adalékolt minták szerkezetét. A SEM és TEM mikroszkópiával végzett lokális vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a karbon nanocsövek (CNT) a szilíciumnitrid szemcsékben, a porozitásokban és a szemcsehatárokon foglalnak helyet. Kiszögű neutronsórálással (SANS) az irodalomban először vizsgáltuk a (CNT) tömbi eloszlását. Modelleink szerint a CNT-k hálószerűen körbefonják a szilíciumnitrid szemcséket. A perkolációs küszöb feletti CNT-t tartalmazó kompozitok fajlagos elektromos vezetőképessége akár 700 S/m-t is elérheti (10t% CNT adalékolás esetében). Azt reméljük, hogy az elektromosan vezető szubsztrát alkalmas lehet elektromos impulzusokkal stimulált sejtnövesztésre.

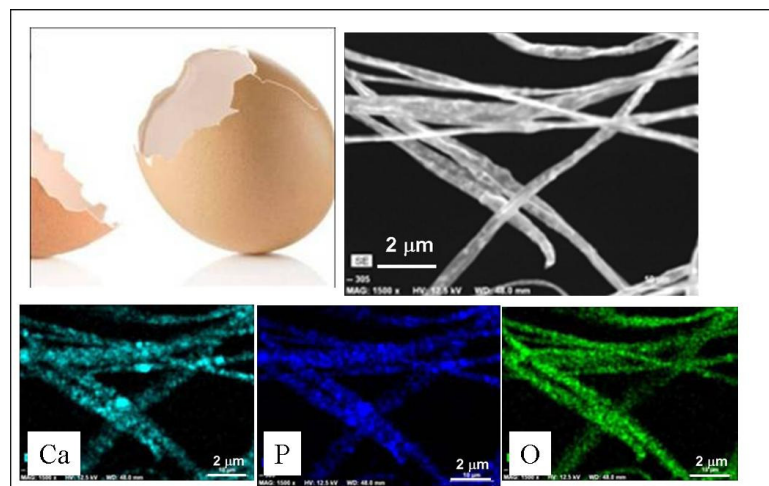
A porózus és tömör szén nanocsöveket is tartalmazó szilíciumnitrid kompozittelemek a prágai fiziológiai intézetében (Bacakova et al.) in-vitro biokompatibilitási teszteknek vetettük

alá. Az eredmények igen biztatóak és azt mutatják, hogy az általunk előállított szilíciumnitrid minták (Si₃N₄-CNT és oxidált Si₃N₄-CNT_{ox} -900°C, 4 óra) felületén hasonló mennyiségű sejt (humán MG-63) települ meg, mint a referencia polisztrén (PS és PS1) mintán és életképességüket is megőrzik.



In vitro kísérletek MG-63 sejt kultúrával.

A munkatervben szerepeltetett célkitűzéseknek megfelelően electrospinning-gel (elektrosztatikus fonás) nHA-biopolimer hibridkompozitokat állítottunk elő arc-, szájbézszereti és ortopédiai célokra. Cellulóz acetát, poli-kaprolakton (PCL), ecetsav, etanol és izo-propil alkohol segítségével szabályozni tudjuk az elektromos fonással előállított szálak morfológiáját és a nHA szemcsék agglomerációját.



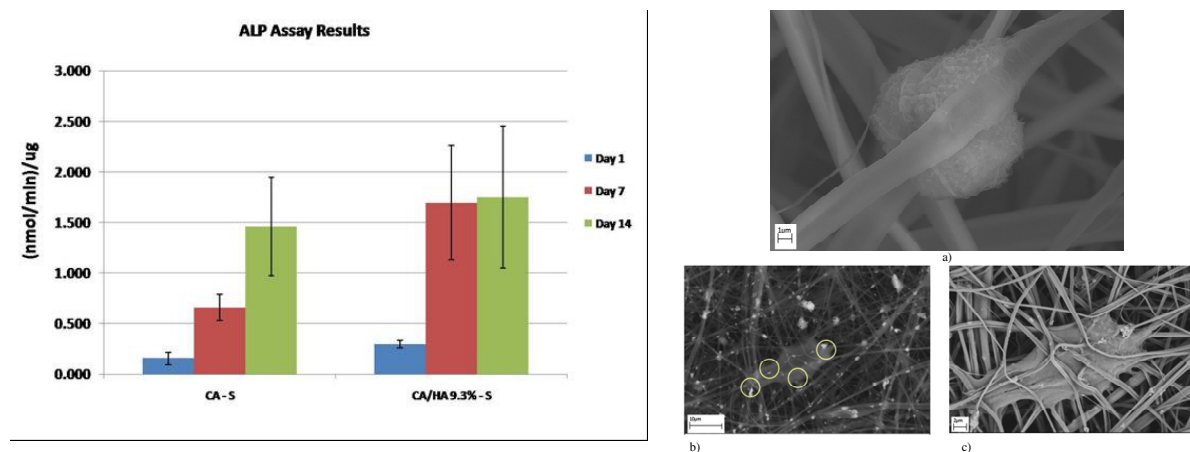
Pasztázó elektronmikroszkópos és energiadíszperzív spektroszkópiával készült felvételek optimált, acetone-propanol-cellulóz acetate-nHa hibridszálak.

A kísérletek alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy az acetone-izopropanolos minták minden tekintetben felülmúlták az acetone-ecetsav oldószerrel készült mintákat. Az

átlagos szálátmérő bár valamivel nagyobb, de sokkal kisebb a szórása. Az nHA diszperziója a CA szálakban egyenletes mind méretben, mind lokális eloszlásban. A polimercsomó (bead) képződés minimális, nincsenek agglomerációk. A mintákban kimutatható a tojásbéjben is megtalálható magnézium nyomelem, amely a biológiai kísérletek során a csontnövekedéshez szükséges ionforrásként szolgált.

Azt tapasztaltuk, hogy szálás hibrid-kompozitok felületén a csontsejtek jól megtapadnak és terjednek. A biokompatibilitás tesztet a Stony Brook Egyetemen (Gouma et al.), Lawrence Berkeley National Laboratory-ban és a West Virginia Egyetem Patológiai Intézetében MTA-NSF projekt keretében együttműködő kollégák segítségével végeztük.

A pásztázó elektronmikroszkopos felvételek alapján az nHA szemcsék átlagos szemcsemérete 35 nm a folyamatos 300 nm-es vastagságú cellulóz acetát (CA) szálakon és homogén eloszlást mutat. A hibrid kompozit graftokat 30 percig 70%-os etanolban sterilizálták és humán SaOS-2 oszteoblaszt sejt kultúrát alkalmaztak a 14 napos in vitro vizsgálatokhoz. A sejtek megtapadását, differenciálódását és funkcionális aktivitását alkalifoszfátáz (ALP) mérésekkel értékeltük. Az ALP mérések általánosan elfogadják a sejtek csontképzésre való alkalmasságának kifejezésére. A nano-graftok pozitív eredményeket mutattak a humán csontsejtek jelenlétében. A hetedik nap után az nHA-t tartalmazó nano-graftok esetében a vizsgált sejtek ALP aktivitása jelentősen megnőtt.

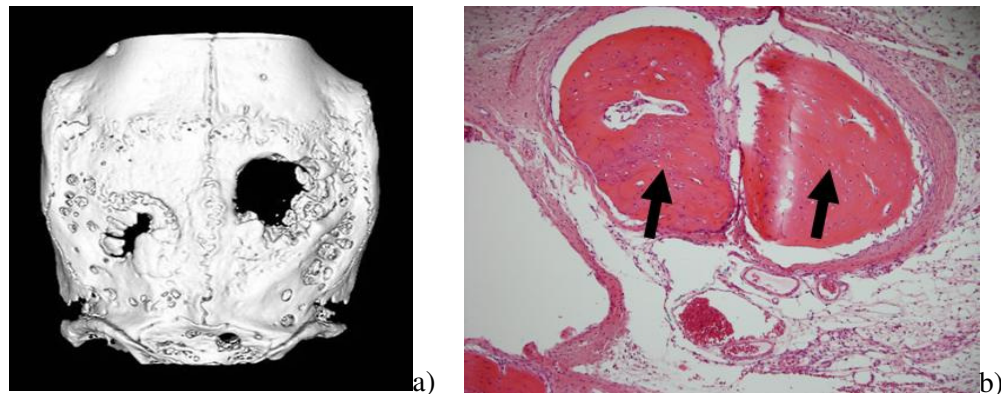


A hibridkompozit nano-graftok ALP aktivitása (baloldali kép). Oszteoblaszt sejtek megtapadása CA szálakon (a) és CA-nHA szálakon (b,c) (jobboldali kép).

Az in vitro megfigyelések során elektronmikroszkopos vizsgálatokat is végeztünk a sejtek megtapadásának, növekedésének és terjedésének vizsgálatára, valamint a sejt-szálak közötti kapcsolat jellemzésére. Megfigyeléseink bizonyították, hogy a CA-nHA szálás nanograftok esetében a sejtek több szállal is kapcsolatba léptek és a polimerszálak mentén

növekedésnek indultak. Az nHA szemcsék a legtöbb esetben a sejtek szélein figyelhetők meg. Ez a tény is azt bizonyítja, hogy az nHA szemcsék aktívan vesznek részt a sejtek elterjedésében. A sejtek megkapaszkodnak az nHA klaszterekben és a hibridszálak mentén növekednek. Az in vitro kísérletek egyértelműen bizonyítják az nHA sejtbioológiai hatását. Az alábbi elektronmikroszkópos felvétel egyértelműen mutatja a CA és a CA-nHA hibridszálak közötti különbséget. A CA szálakon növesztett sejt átlagos mérete $8.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$ és gömbszerű morfológiát mutat. Az oszteoblasztok a CA szálak keskenyebb részén és jellemzően csak egy CA szálon foglalnak helyet. Ezzel ellentétben az nHA-t is tartalmazó (10m% nHA) CA hibridkompozit szálak esetén az oszteoblasztok több szállal és nHA klaszterrel érintkezve, azokban megkapaszkodva laposan kiterülnek, terjednek és növekednek.

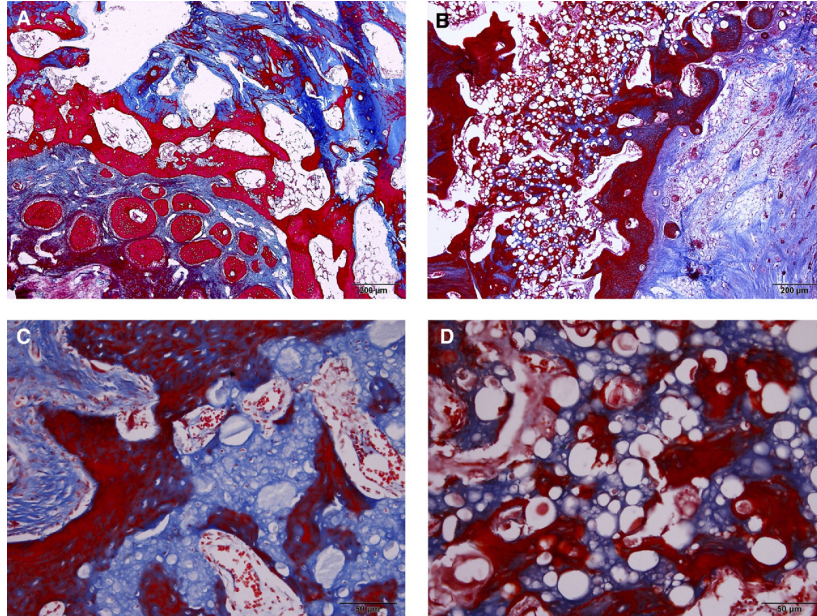
A tojáshejéből előállított nHA bioaktívításának vizsgálatát a koreai Hallym Egyetem, Gangneung-Wonju Egyetem Száj és Arcsebészeti osztály és a Kyongpook Egyetem Biokémiai és Sejtbioológiai Egyetem munkatársaival végeztük. Az új-zelandi típusú nyúlakban elvégzett kísérletekben az nHA graft kiváló bioaktívítást mutatott és lényegesen több csontregenerációt, újsontképződést generált a nem kezelt koponyadefektushoz viszonyítva.



a) Nyúlkoponya CT újsont képződést mutat 8 hét alatt (a baloldali defektusban, jobboldali lyuk a referencia). b) 8 hét utáni szövettani eredmény: az nHA adagolás hatására jól láthatóan kialakuló újsont szigetek.

Minden mérhető paraméter a μ -CT analízis során azt mutatta, hogy az nHA graftot tartalmazó csoport szignifikánsan nagyobb értékeket eredményezett, úgy 4, mint a 8 hetes vizsgálatok alatt a kontroll csoportokhoz viszonyítva ($p < 0.05$). Figyelembe véve azt a tény, hogy a tojáshej egy olcsó kiindulási anyag, az abból készített nHA kiváló kalciumforrás lehet a csontpótlásban és csontrekonstrukciók során. A tojáshejéből előállított nHA a kereskedelmi nHA-val összehasonlítva is kiváló bioaktívítást mutatott. 8 hét in vivo vizsgálat után a szövettani mérések 27.50% újsont képződést mutattak a kontroll csoportban, 38.62 % -ot a

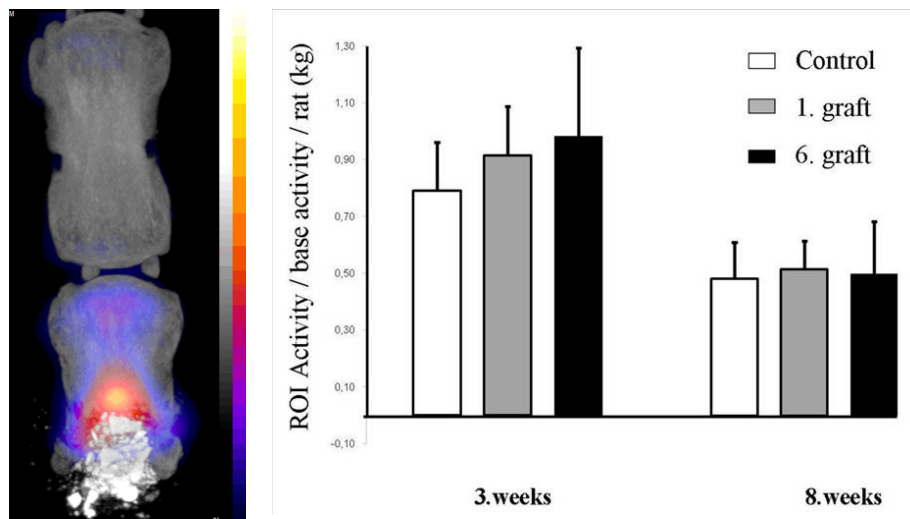
kereskedelmi referencia mintában és 41.99 % -et a tojáshéjből előállított nHA csoportban. A kereskedelmi minta nem hozott szignifikáns különbséget a kontroll mintával összehasonlításban, ellentétben az nHA-val.



8 hét utáni szövettani vizsgálat a kereskedelmi és a tojáshéjből előállított nHA összehasonlítása. A) nHA tojáshéjből (marker: 200 μ m). B, Kereskedelmi nHA (marker: 200 μ m). C, A regenerált új csont kitölti a defektus minden részét és a remanens nHA beépül az újcsontba (marker: 50 μ m). D, a kereskedelmi nHA megőrzi eredeti gömb alakját és nem alakul át új csonttá (marker: 50 μ m).

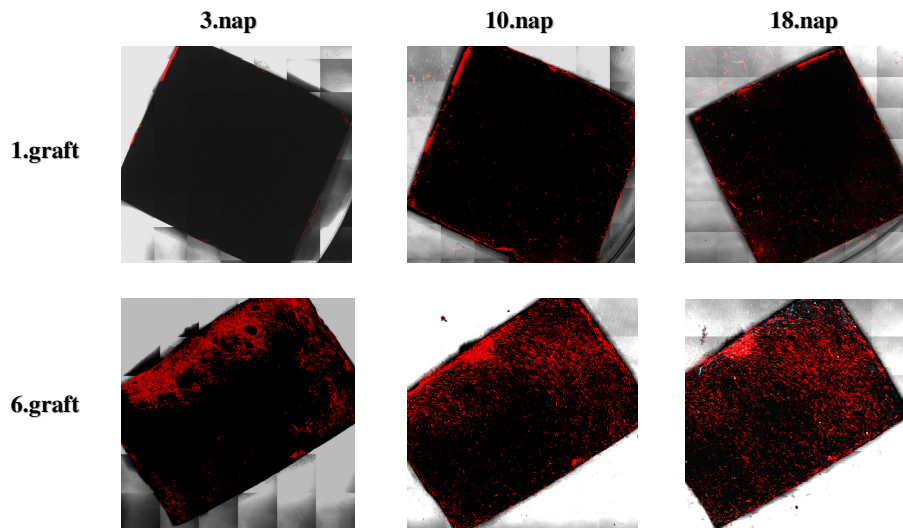
Cirkóniumoxid mátrixú és nano-hidroxiapatit (nHA) tartalmú, illetve karbon nanocső (CNT) és nHA kompozitokat állítunk elő gyorsszinterelés (spark plasma sintering (SPS)) módszerrel, illetve levegőn történő hőkezelésekkel. A nagysebességű szinterelési technológia szakmai indoklása egy új típusú szinterelési technika (SPS-spark plasma sintering, FAST – gyors szinterelés) alkalmazásán alapszik, amellyel új tulajdonságú nanoszerkezetű kompozitok állíthatók elő. A mindössze néhány perces felfűtésen alapuló technológia amellyel, hogy kiküszöbölje az eddigi szinterelési eljárások hátrányait (túlzott szemcsenövedés és a nanoszerkezet megszűnése, a nanocsövek degradációja, eltűnése) lehetővé teszi a szinterelés alatt lejátszódó folyamatok (fázisátalakulás, kristályosodás, szemcsenövedés) szétválasztását és e folyamatok önálló tanulmányozását, valamint a nanoszerkezet megőrzését. Az SPS kísérleteket az Isztambuli Műegyetemen, Sumimoto, Dr. Sinter SPS berendezéssel végeztük (Cinar et al). A kompozitok szerkezeti és mechanikai vizsgálataival kimutattuk, hogy az előállított kompozitok hajlítási szilárdsága 100-150MPa közé tehető, ami az emberi csont (femur) jellemző érték.

A Semmelweis Egyetem kutatóival (Lacza et al.) együttműködésben elvégeztük a szinterelt graftok in vitro és in vivo vizsgálatát. Az in vitro vizsgálatok célja a humán csontvelői őssejtek (hBMSC) kitapadása szempontjából legalkalmasabb graft kiválasztása volt, amely mint felületkezelő anyag alkalmas lehet pl: protézisek bevonásakor. Az in vivo kísérletek célja, annak vizsgálata, hogyan valósítható meg az in vitro eredmények alapján kiválasztott graftok beépülési képességének, tehát önálló graftként való alkalmasságának vizsgálata patkány csigolya csontdefektus modellben való alkalmazása. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy az in vivo esetben, a porított formában alkalmazott karbontartalmú graft a tisztán hidroxipatit tartalmúhoz és a kontrollhoz hasonló mértékben növelte az osteoblast aktivitást, tehát a szén nanocső hozzáadása nem javítja a már alkalmazott nHA graftok beépülési képességét.



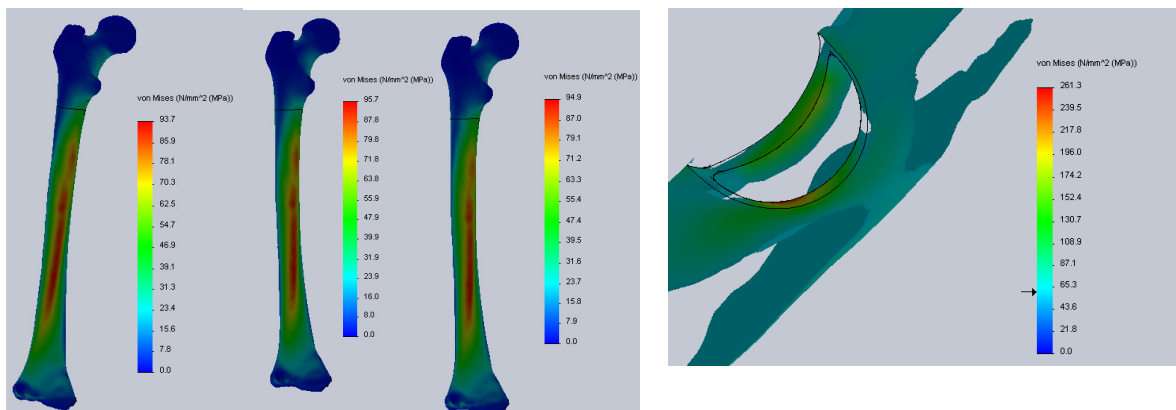
Szinterelt majd porított graftok patkány csigolya in vivo NANOSPECT-CT vizsgálata és oszteoblaszt aktivitásának kiértékelése nHA (1.graft) és nHA-CNT (6. graft) estében.

In vitro kísérletek alapján megállapítottuk, hogy az nHA tartalom csökkentése és ZrO_2 ezzel egyidejű növelése nem eredményezett különbséget a sejtek kitapadásában és proliferációjában. Azonban, a többrétegű szén nanocső hozzáadása a magas nHA tartalmú grafthoz szignifikánsan növelte a kitapadó sejtek proliferációját. Mivel a szén nanocső tartalmú nHA grafton gyorsabb a csontvelői őssejtek proliferációja, mint a tisztán hidroxipatit tartalmúakon, ezért ortopédiai protézisek bevonása esetén azoknál alkalmasabb lehet.



In vitro oszteoblaszt sejtkitapadási vizsgálat nHA (1.graft) és nHA-CNT (6. graft) szinterelt graftok estében.

Az implantátumok kísérleti megvalósítása első lépéseként, a projekthez kapcsolódó TDK munka keretében a femur 3D modellezését is elvégeztük. A femurt epiphysis és diaphysis régiókra osztva különböző anyagjellemzőket beállítva vizsgáltuk a normál járás során fellépő terhelésre adott reakciókat. Az eredmények kiértékelése során megfigyelhetük, az erők hatására történő elmozdulásokat és meghatároztuk a terhelések mely területeken okoznak veszélyes feszültségeket. Ezek az ismeretek egy implantátum kifejlesztése során nélkülözhetetlenek.



Feszültségmezők a femurban különböző anyagmodellek alapján.

65 MPa vagy magasabb az implantátum hajlító szilárdsága.

A femur diaphysis egy részének gyorsprototípus (RP) technológiában használatos anyaggal történő helyettesítése előrevetíti az alkalmazni kívánt anyag tulajdonságainak követelményeit. Ezek az eredmények tovább segíthetik az implantátum anyagok kifejlesztését. Megállapítottuk, hogy az implantátumok geometriai kialakítása fontos szerepet játszik az implantátum beillesztésekor és használatakor kialakuló feszültségekre nézve. A

feltételezett traumatológiai sérülés geometriájának figyelembevételével, végeelem módszer (VEM) segítségével és egy újonnan kifejlesztett nano-HAp-ot tartalmazó polimer segítségével kialakítható olyan implantátum, amely a csont anyagához hasonló tulajdonságokkal rendelkezik, megfelelő geometriájú és eredményesen segíti a csont regenerációját, miközben nem okoz inflamációt, ezért eltávolítására illetve cseréjére nincs szükség.

A jövőben folytatjuk az eddigiekben kifejlesztett kompozitok tulajdonságainak javítását, vagy legalábbis ezekkel összemérhető paraméterekkel rendelkező, ugyanakkor könnyebben kezelhető, olcsóbban előállítható és megbízható mechanikai tulajdonságokkal jellemezhető, stabil, biokompatibilis kerámia mátrixú kompozitok kifejlesztését.

A kutatási téma népszerűsítése, hazai és nemzetközi elismertsége

A kutatási témáról riportfilmek készültek: 2009 február 31-i Géniusz műsorban (M1 és M2) és m2-tévéműsorban (Tojánhéjból csontszövet 2010 április 12).

A kutatás témájában 40 közlemény jelent meg (ebből 14 tudományos folyóiratban- 11 impakt faktoros közlemény-, 4 könyvfejezet jelent meg és több mint 50 előadás (ebből 10 meghívott) hangzott el.

A kutatás témájában 3 nemzetközi szimpóziumot rendeztünk:

- EMRS FALL Meeting 2009 keretében szimpózium szervezése, Symposium F: Novel bio&chemosensing materials for health, safety and security applications, több mint 51 szakértő részvételével.
- EU-Korea Workshop „BIOMATERIALS: NOVEL CONCEPTS AND APPLICATIONS”, Budapest, 2010.10.14, 15-20 fő részvételével.
- Hungary-Korea Seminar, Gangneung-Wonju University, Dentistry School, 2010.11.29, Gangneung, Dél-Korea., 20 fő részvételével.

A kutatási témában 2 TDK I helyezést, egy OTDK II helyezést, és két OTDK dicséretet is szereztünk (2010 és 2011-ben Tóth Mihály és Kulcsár Imre).

Az MTA-MFA Nyári iskola keretében, a témában Ferenc Katalin középiskolás diák megjelentetett egy közleményt (Élet és Tudomány LXV, 37. szám, 2010).