

DISS. ETH NO. 17484

**APPLICATION OF NANOPARTICULATE BIOMATERIALS FOR
INJECTABLE BONE CEMENTS AND DENTAL REPAIR**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

presented by

TOBIAS J. BRUNNER

M.Sc. ETH

born on June 5th 1979

Austrian citizen

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. W. J. Stark, examiner

Prof. Dr. V. Vogel, co-examiner

Dr. Aldo Boccaccini, co-examiner

Zürich, 2007

Zusammenfassung

Die Reparatur und Regeneration von durch Trauma, Tumor, Osteoporose oder anderweitig verursachten Knochendefekten stellt ein ernsthaftes klinisches Problem für die Orthopädie dar. Knochenersatzmaterialien, genauer Kalziumphosphate, gewinnen aufgrund ihrer positiven *in vivo* Antworten wie Biokompatibilität, Bioaktivität und Osteokonduktivität zunehmend an Bedeutung. Allerdings schränken konventionelle Herstellungsmethoden für Kalziumphosphate nach wie vor die Auswahl an verfügbaren Materialien für den Chirurgen ein.

In der vorgelegten Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Biomaterialien wie Kalziumphosphaten und bioaktiven Gläsern in nanopartikulärer Form eine schnellere Wirkungsweise besitzen und dadurch neue Wege für Knochenregeneration und dentale Applikationen eröffnen. Ermöglicht wurde diese Arbeit durch Fortschritte in der Flammensprühsynthese, welche die Produktion von komplexen Salznanopartikeln erlauben.

Kapitel 1 gibt eine allgemeine Einführung in das Gebiet des Knochenersatzes und der Knochenrekonstruktion und beschreibt die Probleme, welche gegenwärtige Implantate und Biomaterialien bewältigen müssen, um eine bessere Leistung zu erzielen. Die Überwindung dieser Barrieren könnte die Lebensqualität von Patienten verbessern und Revisions- und Gesundheitskosten reduzieren.

Kapitel 2 befasst sich mit dem Thema der Sicherheit oder Toxizität von Nanopartikeln, welche in einem *in vitro* System mittels Zellkulturen untersucht wurde. Eine solche Untersuchung ist äusserst wichtig bevor über eine Anwendung der nanopartikulären Materialien für Implantate für den Menschen nachgedacht wird. Zusammen mit der Empa St. Gallen wurde die Zytotoxizität von sieben verschiedenen Nanopartikeln mit Asbest als Kontrolle getestet. Die Resultate zeigen, dass bei den untersuchten Konzentrationen die Löslichkeit des Materials einen entscheidenden Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat. Die Vitalität der Zellen, welche Trikalziumphosphat ausgesetzt waren, war praktisch

unverändert. Ausserdem wurden die neuen Trikalziumphosphatpartikel in wässrigem Milieu innerhalb von Minuten zu Apatit umgewandelt, das dem menschlichen Knochenmineral sehr ähnlich ist. Basierend auf diesen Tatsachen wurde beschlossen, dass eine Anwendung solcher bioaktiver Nanopartikel weiter untersucht werden kann.

Kapitel 3 beschreibt die Verwendung von amorphen Trikalziumphosphat-Nanopartikeln für Kalziumphosphat-Zemente mit Apatit als Endprodukt. Eines der bislang reaktivsten Trikalziumphosphate für diese Anwendung ist die α Phase des Trikalziumphosphats, welches auf konventionellem Weg bis auf Mikrometergrösse gemahlen werden kann. Ein Vergleich isothermischer Kalorimetriedaten zeigte, dass die Nanopartikel im Vergleich zu konventionellem α -TCP eine stark erhöhte Reaktivität besitzen. Das nanopartikuläre Material wurde innerhalb von 40 Minuten zu Apatit umgewandelt, während die Reaktion von mikrometergrossen α -TCP mehrere Stunden bis Tage benötigte. Zusätzlich hatte der ausgehärtete Zement aus Nanopartikeln eine sehr grosse spezifische Oberfläche von $160 \text{ m}^2/\text{g}$. Ein Nachteil des neuen Zements war die geringe mechanische Stabilität, welche durch die hohe Porosität verursacht wurde. Die hohe Porosität wiederum war ein direktes Resultat der grossen Oberfläche, da mehr Flüssigkeit zugegeben werden musste um überhaupt eine Zementpaste zu formen. Abhängig von der geplanten klinischen Applikation würde dies einer vorherigen Verbesserung bedürfen.

Kapitel 4 befasst sich detaillierter mit der Reaktivität von neun verschiedenen Trikalziumphosphaten um ein eingehenderes Verständnis für die Reaktionskinetik zu entwickeln. Die Daten der volumetrischen Partikelgrössenverteilung erlaubten die Einführung einer Auflösungstiefe, die - in Kombination mit den Daten der isothermischen Kalorimetrie - eine Bestimmung der Reaktionskinetik ermöglichte. Diese experimentellen Daten konnten dem „Shrinking Core Model“ und verschiedenen Szenarien dieses Modells zugeschrieben werden. So konnte der limitierende Schritt der Abbindereaktion eruiert werden. Die Resultate verdeutlichten, dass Nanopartikel nach einem fundamental anderen Mechanismus reagierten, bei welchem nicht die chemische Reaktion an sich limitierend war, sondern die Diffusion der Reaktanden in der Flüssigkeit.

In Kapitel 5 wurde die Flammensprühsynthese für die Herstellung verschiedener Gläser (von Kalk-Natron-Glas bis hin zu verschiedenen bioaktiven Gläsern) in der Form von Nanopartikeln angewendet. Die Herstellung von Materialien bestehend aus bis zu sechs Elementen belegte die Vielseitigkeit des Prozesses zur Synthese komplexer Materialien oder zur Einführung von Dotierungen. Dies setzt allerdings das Wissen über die chemische Komplexität der Herstellung entsprechender Metall- und Anionenprecursor voraus. Eine Vorstudie zur *in vitro* Bioaktivität zeigte, dass bioaktive Gläser in nanopartikulärer Form aufgrund der raschen Bildung einer Apatitschicht auf der Oberfläche höchst bioaktiv sind und deshalb ein sehr chancenreiches Biomaterial darstellen.

Die darauf folgende Arbeit, beschrieben in Kapitel 6, wendete die bioaktiven Gläser aus Kapitel 5 für spezifische Anwendungen in der Zahnmedizin an. Ermöglicht wurde dies durch eine enge Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Universitätsspitals Zürich. Bioaktive Gläser besitzen gewisse antimikrobielle Eigenschaften welche auf die Freigabe von Ionen und einen Anstieg des pHs in wässriger Lösung zurückgeführt werden kann. Durch eine Verkleinerung der Partikel und der dadurch gegebenen Vergrößerung der Oberfläche verursachten Nanopartikel von bioaktivem Glas einen höheren pH-Wert, welcher in einer verbesserten antimikrobiellen Wirksamkeit resultierte. Dieser Effekt wurde durch Exposition des Glases mit *Enterococcus faecalis* (einem Mikroorganismus, welcher häufig in persistenten endodontischen Infektionen gefunden wird) und klinischen Isolaten getestet. Zusätzlich wurde *in vitro* das Potential des Glases für die Reparatur von korrodiertem Zahnmaterial untersucht. Künstlich demineralisiertes menschliches Dentin wurde für bis zu 30 Tage mit nanopartikulärem bioaktivem Glas behandelt. Mittels gravimetrischer Analysen war es möglich zu zeigen, dass die Nanopartikel - im Gegensatz zu Referenzmaterial in Mikrometergrösse - eine Zunahme des Mineralgehalts auslösen. Dies machte deutlich, dass diese Nanopartikel in der Lage sind, menschliches Dentin zu remineralisieren.

Kapitel 7 fasst generelle Schlussfolgerungen der präsentierten Doktorarbeit sowie zukünftige Forschungsrichtungen mit Schwerpunkt auf klinische Anwendung zusammen.

Summary

Bone repair and regeneration of defects arising from trauma, tumor, osteoporosis or other origin offer a complicated and serious clinical problem in orthopedic surgery. Bone substitute materials, in particular calcium phosphates, are becoming of increasing importance in the field of biomaterials because of their positive *in vivo* responses including biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity. Conventional calcium phosphate preparation methods, however, still limit the range of accessible materials to the surgeon.

In the presented thesis we have shown that the application of biomaterials such as calcium phosphates and bioactive glasses in nanoparticulate form exhibit an enhanced mode of action and open up new vistas for bone reconstruction and dental applications. This work was made possible by advances in flame spray synthesis enabling the production of complex salt nanoparticles.

Chapter 1 gives a general introduction to the field of bone substitution and reconstruction and describes the hurdles and problems current implants and biomaterials have to overcome in order to improve their performance and therefore the quality of life of the patient, reduce revisions and health care costs.

Chapter 2 is dealing with an urgent matter being the safety or toxicity of nanoparticles which was tested in cell cultures *in vitro*. This investigation is crucial before thinking about using these nanoparticulate materials within the human body in implants. Together with the Empa St.Gallen we tested the cytotoxicity of seven different nanoparticles using asbestos as control. The results showed that the solubility of the material has a profound effect on the cell viability at investigated concentrations. Given the fact that the viability of cells exposed to tricalcium phosphate was almost unchanged and tricalcium phosphate particles were converted to apatite, similar to natural bone mineral, within minutes when exposed to aqueous solutions we felt that the application of such bioactive nanoparticles can be further investigated.

Chapter 3 describes the use of amorphous tricalcium phosphate nanoparticles in apatite calcium phosphate cements. One of the hitherto most reactive calcium phosphate material for this use is the α phase of tricalcium phosphate (α -TCP), which can be milled to micron size. Results from isothermal calorimetry showed that the nanoparticles were more reactive when compared to conventionally α -TCP prepared by milling. The nanoparticulate material was converted to apatite within 40 minutes whereas the micron-sized α -TCP reaction required several hours to days. Additionally, the set cement derived from the nanoparticles had a very high specific surface area of 160 m²/g. The only drawback of this new cement was the low mechanical stability which can be explained by high porosity. The high porosity was a direct result of the high surface area because more liquid needed to be added in order to form a cementitious paste. Depending on the targeted clinical application this would require further improvement.

Chapter 4 studies the reactivity of a set of nine different tricalcium phosphates in more detail in order to develop a more circumstantial understanding of the reaction kinetics. The data from the volumetric particle size distributions allowed the introduction of a dissolution depth which, in combination with isothermal calorimetry data, allowed the determination of the reaction kinetics. These experimental data could then be ascribed to the shrinking core model and different scenarios thereof which defined the limiting step of the setting reaction. Results revealed that the nanoparticles reacted with a fundamentally different mechanism in which not the chemical reaction was limiting but the diffusion of the reactants in the liquid.

In chapter 5 flame spray synthesis was applied to prepare different glasses in the form of nanoparticles from soda-lime glass to miscellaneous bioactive glasses. The preparation of materials consisting of up to six elements proved the broad versatility of the process to synthesize complex materials or introduce dopants once the chemical complexity of making suitable metal and anion precursors has been elaborated. A preliminary *in vitro* bioactivity study showed that bioactive glass in nanoparticulate form is highly bioactive due to the fast formation of an apatite layer on the surface and therefore is a very promising biomaterial.

The following work described in Chapter 6 employed the bioactive glass described in chapter 5 for specific applications in dentistry. This was possible due to a close collaboration with the Center of Dental Medicine of the University Hospital Zurich. Bioactive glasses are known to have some antimicrobial potential provoked by the release of ions resulting in a rise in pH in aqueous solutions. Due to a decrease in size and an increase in surface area the nanoparticles of bioactive glass caused a much higher pH which resulted in a higher antimicrobial efficacy, which has been tested by exposure of the glass to *Enterococcus faecalis* (a microorganism commonly detected in persistent endodontic infections) as well as clinical isolates. Additionally, the potential of the glass to repair corroded tooth material has been investigated *in vitro*. Artificially demineralized human dentin was treated with nanoparticulate bioactive glass for up to 30 days. By means of gravimetric analyses it was possible to show that the nanoparticles provoke an increase in mineral content and were therefore able to remineralize human dentin in contrast to micron-sized reference material.

Chapter 7 summarizes general conclusions of the presented thesis as well as an outlook on future research directions with emphasis towards clinical applications.