

I N Ż Y N I E R I A BIOMATERIAŁÓW

ENGINEERING OF BIOMATERIALS
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW

Numer 12
Rok III
ISSN 1429-7248

GRUDZIEŃ 2000

WYDAWCA:

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

KOMITET REDAKCYJNY:

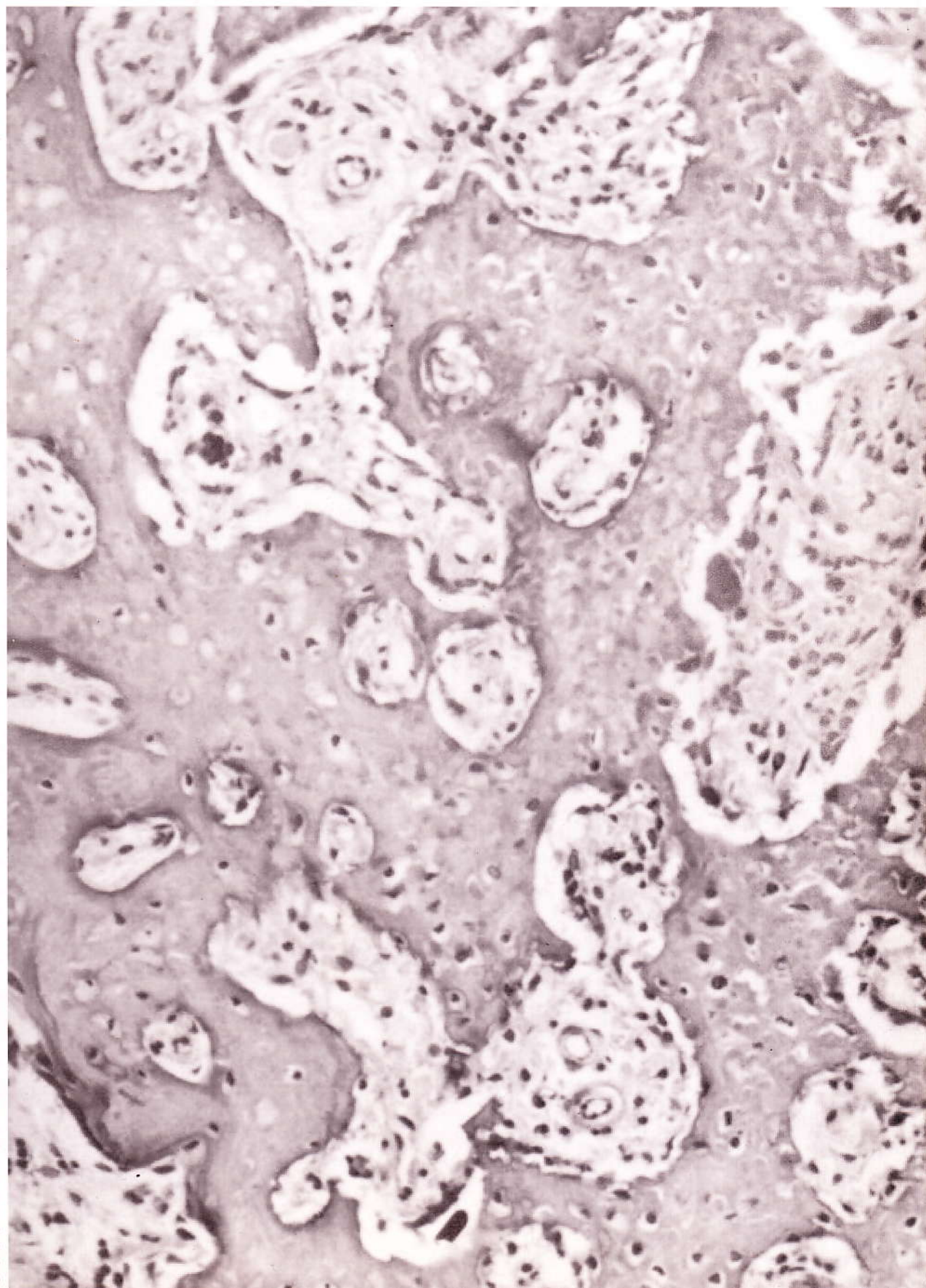
Redaktor naczelny
Stanisław Błażewicz
Sekretarz redakcji,
Skład komputerowy
Augustyn Powroźnik
Redaktorzy
Elżbieta Godlewska
Cezary Wajler

RADA NAUKOWA:

Jan Ryszard
Dąbrowski
Politechnika Białostocka
Monika
Gierzyńska-Dolna
Politechnika
Częstochowska
Andrzej Górecki
Akademia Medyczna
Warszawa
Wojciech Maria Kuś
Akademia Medyczna
Warszawa
Jan Marciniak
Politechnika Śląska
Stanisław
Mazurkiewicz
Politechnika Krakowska
Roman Pampuch
Akademia
Górnictwo-Hutnicza
Bogna Pogorzelska-
Stronczak
Śląska Akademia
Medyczna

ADRES REDAKCJI:

Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków



SPIS TREŚCI

HISTOLOGICZNA OCENA KOMPOZYTU WĘGIEL-ŻYWICA EPOKSYDOWA W OPARCIU O BADANIA DOŚWIADCZALNE NA ZWIERZĘTACH	3
--	---

GRZEGORZ BAJOR, DANIEL SABAT, ZBIGNIEW SZCZUREK

REGULACJE PRAWNE I ASPEKTY ETYCZNE W BADANIACH DOŚWIADCZALNYCH NA ZWIERZĘTACH	8
---	---

LESZEK SOLSKI

WCZESNY ODCZYN TKANKOWY PO IMPLANTACJI CERAMIKI NISKOPOROWATEJ O MODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI. BADANIA DOŚWIADCZALNE	12
--	----

J. STANISZEWSKA-KUŚ, B. ZBOROMIRSKA-WNUKIEWICZ,
R. LEWANDOWSKI, L. SOLSKI, J. WNUKIEWICZ,
B. ŻYWICKA

WŁÓKNA Z REGENEROWANEJ CHITYNY. BADANIA BIOLOGICZNE	17
--	----

DANUTA PALUCH, STANISŁAW PIELKA, LIDIA SZOSLAND,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ, MARIA SZYMONOWICZ,
LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

MATERIAŁY KOMPOZYTOWE Z NOWEGO BIODEGRADOWALNEGO KOPOLIMERU GLIKOLID-LAKTYD DLA CELÓW MEDYCZNYCH	23
---	----

ELŻBIETA PAMUŁA, JAN CHŁOPEK, MARTA BŁĄŻEWICZ,
KATRI MAKINEN, PIOTR DOBRZYŃSKI,
JANUSZ KASPERCZYK, MACIEJ BERO

STUDY OF THE SURFACE PROPERTIES OF C-C COMPOSITES AS BIOMATERIALS	28
--	----

M. BUREŠOVÁ, K. BALÍK

CONTENTS

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF CARBON-EPOXY RESIN COMPOSITE BASED ON EXPERIMENTS ON ANIMALS	3
---	---

GRZEGORZ BAJOR, DANIEL SABAT, ZBIGNIEW SZCZUREK

THE LEGAL REGULATIONS AND ETHICAL PROBLEMS CONCERNING THE USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS IN BIOMEDICAL RESEARCH	8
---	---

LESZEK SOLSKI

EARLY TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF SURFACE-MODIFIED CERAMICS. EXPERIMENTAL STUDY	12
--	----

J. STANISZEWSKA-KUŚ, B. ZBOROMIRSKA-WNUKIEWICZ,
R. LEWANDOWSKI, L. SOLSKI, J. WNUKIEWICZ,
B. ŻYWICKA

BIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE REGENERATED CHITIN FIBRES	17
--	----

DANUTA PALUCH, STANISŁAW PIELKA, LIDIA SZOSLAND,
JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ, MARIA SZYMONOWICZ,
LESZEK SOLSKI, BOGUSŁAWA ŻYWICKA

COMPOSITE MATERIALS FROM A NEW BIODEGRADABLE GLYCOLIDE-LACTIDE CO-POLYMER FOR MEDICAL APPLICATIONS	23
---	----

ELŻBIETA PAMUŁA, JAN CHŁOPEK, MARTA BŁĄŻEWICZ,
KATRI MAKINEN, PIOTR DOBRZYŃSKI,
JANUSZ KASPERCZYK, MACIEJ BERO

STUDY OF THE SURFACE PROPERTIES OF C-C COMPOSITES AS BIOMATERIALS	28
--	----

M. BUREŠOVÁ, K. BALÍK

HISTOLOGICZNA OCENA KOMPOZYTU WĘGIEL - ŻYWICA EPOKSYDOWA W OPARCIU O BADANIA DOŚWIADCZALNE NA ZWIERZĘTACH

GRZEGORZ BAJOR*, DANIEL SABAT**, ZBIGNIEW SZCZUREK**

*KATEDRA CHIRURGII DZIECIĘCEJ

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W BYTOMIU

**ZAKŁAD PATOMORFOLOGII

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W ZABRZU

Streszczenie

Dla celów realizacji tego eksperymentu użyto królików, którym wszczepiano do światła jamy szpikowej kości udowej grot z kompozytu węgiel - żywica epoksydowa. Kompozyt ten charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, co między innymi ułatwia obróbkę mechaniczną, umożliwia otrzymywanie implantów o złożonych kształtach.

Do eksperymentu użyto sześć królików z zastosowaniem kompozytu włókno węglowe, osnowa epoksydowa pokrytych warstwą hydroksyapatytu /implant C-ep-HAP / w okresach obserwacji 4, 14, 18, 20, 22 tygodni.

Celem przeprowadzonego badania było określenie przydatności tego materiału jako elementu zespalającego kość, oraz jego biogodności. Wykazano, że w szpiku kostnym otaczającym grot zachodzą procesy resorpcji, a następnie odbudowy kości aż do powstania dojrzałej kości gąbczastej. Tym przemianom towarzyszyła postępująca biodegradacja fragmentów wszczepu, aż do powstania zbrylonych struktur i ich pyłowego rozpadu. Fragmenty tego materiału działają stymulująco na odnowę kości gąbczastej i nie wywoływały odczynu olbrzymiomórkowego ani zmian bliznowatych.

W oparciu o przeprowadzone badania potwierdzono walory wytrzymałościowe tego materiału oraz jego biogodność. Natomiast uzyskano jedynie potwierdzenie powolnej biodegradacji rozpoczynającej się na powierzchni tego materiału.

Słowa kluczowe: biomateriały, kompozyty węglowe, żywica epoksydowa, histopatologia, badania na zwierzętach

Wprowadzenie

Do istotnych czynników decydujących o wykorzystaniu materiałów kompozytowych z włóknami węglowymi w medycynie należy zaliczyć możliwości spełnienia wymogów biofunkcyjności oraz przeświecalności dla promieniowania rentgenowskiego. Pomimo, że kompozyty węgiel-węgiel uważa się za atrakcyjne dla wielu dziedzin medycyny, w tym także dla chirurgii dziecięcej, to jednak szerokie zastosowanie tych materiałów staje się ograniczone z uwagi na znaczną ich kruchość [1, 2, 7]. Dla polepszenia właściwości mechanicznych, zwłaszcza ograniczenia kruchości, kompozyty węgiel-węgiel próbuje się zastępować kom

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF CARBON-EPOXY RESIN COMPOSITE BASED ON EXPERIMENTS ON ANIMALS

GRZEGORZ BAJOR*, DANIEL SABAT**, ZBIGNIEW SZCZUREK**

*DEPARTMENT OF CHILDREN SURGERY

SILESIA MEDICAL ACADEMY IN BYTOM

**DEPARTMENT OF PATHOMORPHOLOGY

SILESIA MEDICAL ACADEMY IN ZABRZE

Abstract

Rabbits with the arrow head-shaped carbon-epoxy resin composite implanted into the femoral bone marrow cavity were used in the experiment. The composite has very good mechanical properties, which enable mechanical working and formation of complex shapes.

Six rabbits with implants made of carbon fibre - epoxy resin composite, coated with hydroxyapatite / C-ep-HAP implant/, were used in 4, 14, 18, 20, 22 weeks of observation.

The aim of the experiment was to determine the usefulness of the composite material as an element uniting bones as well as its biocompatibility. It has been shown that in the bone marrow surrounding the implant there take place the processes of resorption and bone restoration leading to the formation of a mature spongy bone. These changes are accompanied by progressive biodegradation of the implanted fragments, i.e. lumping and dusting. Fragments of the implanted material stimulate restoration of spongy bone and do not cause giantocellular reaction or cicatricial changes.

The investigations carried out in this work confirmed good strength and biocompatibility of the implant material. Only slow biodegradation beginning on the surface of the material was observed.

Key words: biomaterials, carbon composites, epoxy resin, histopathology, experiments on animals

Introduction

Possibility of fulfilling the biofunctionality requirements and transparency for x-ray radiation are decisive factors for the application of composite materials with carbon fibres in medicine. Although carbon-carbon composites are regarded attractive in many fields of medicine, paediatric surgery in particular, their wide use becomes limited because of fragility [1, 2, 7]. To improve their mechanical properties, and to reduce their fragility in particular, these composites are replaced by composite with polymer matrix. Carbon fibre - polymer matrix gives new possibilities of application in medicine. Owing to the carbon fibres they have suitable flexibility, are better tolerated by the organism than metallic materials, do not undergo corrosion and are light and translucent to the x-ray radiation. To accelerate the formation of a stable union of the implant with the bone tissue, hydroxyapatite coating is applied.

Both thermoplastic and thermosetting polymers are sug-

pozytami o osnowie polimerowej. Kompozyty włókno węglowe-osnowa polimerowa stwarzają nowe możliwości aplikacyjne w medycynie. Dzięki połączeniu z włóknem węglowym uzyskują one odpowiednią elastyczność, są lepiej tolerowane przez organizm niż materiały metaliczne, nie ulegają procesowi korozji, są lekkie i nadal przeświecalne dla promieni rentgenowskich. Aby przyspieszyć trwałe połączenie implantu z tkanką kostną zastosowano pokrycie z materiału bioaktywnego jakim jest hydroksyapatyt.

Materiałami stosowanymi na osnowy kompozytów węglowo-organicznych są zarówno polimery termoplastyczne jak i termoutwardzalne. Dla potrzeb tego eksperymentu użyto żywicy epoksydowej, należącej do grupy materiałów termoutwardzalnych.

Celem pracy była ocena przydatności kompozytu węgl- żywica epoksydowa do zespoleń kostnych. Szczególną uwagę zwrócono na wiązanie się implantu z kością w okresie wzrostu. Obserwowano materiał i okoliczne tkanki na obecność tzw. szczątków zużycia powstałych z nieprereagowanych monomerów lub toksycznych dodatków.

Materiały i metodyka

Do doświadczenia użyto sześć królików rasy mieszanej w okresie wzrostu kostnego o wadze nie przekraczającej 2500 g. Materiał poddany ocenie histopatologicznej stanowił kompozyt włókno węglowe-żywica epoksydowa, pokryty warstwą hydroksyapatytu (implant C-ep-Hap). Materiał implantowany do jamy szpikowej oraz okoliczną tkankę kostną oceniano histopatologicznie po upływie 4, 14, 18, 20 i 22 tygodni.

Pochodzenie zwierząt doświadczalnych, miejsce ich przebywania i sposób przygotowania materiałów do badań histopatologicznych zostały szczegółowo określone we wcześniejszych publikacjach.

Wyniki badań

W materiale doświadczalnym obserwowanym po upływie 4 tygodni znaleziono złogi węglowe złożone z wyraźnie skróconych włókien inkrustujących chrząstkę szklistą w pobliżu trzpienia. Sama chrząstka wykazywała cechy rozplywania się istoty podstawowej. W tym okresie nie stwierdzano obecności wolnych cząstek żywicy epoksydowej. Obecność chrząstki szklistej może wskazywać na metaplastę chrzęstną tkanki kostnej spotykaną często u zwierząt doświadczalnych.

W pobliżu trzpienia węglowego stwierdzano obecność kości gąbczastej z cechami resorpcji, o czym świadczyły nieliczne osteoklasty i pojedyncze fragmenty krótkich włókien węglowych (RYS. 1).

W preparatach z 14 tygodnia obserwacji znaleziono w najbliższym sąsiedztwie trzpienia węglowego drobne owalne beleczki kostne w fazie żywej odbudowy. Stwierdzono tam zdecydowaną obecność sznurów osteoblastów pokrywających beleczki kostne. Dość liczne, poszerzone naczynia krwionośne wypełnione były krwinkami czerwonymi. Na brzegu opisywanych struktur znaleziono nieliczne drobne fragmenty węgla.

Na obwodzie wyżej opisanych zmian cienkie beleczki kostne były w pełni ukształtowane. Tylko pojedyncze osteoklasty zlokalizowane w pewnym oddaleniu od beleczki wskazywały na zakończony proces resorpcji. Nadto u wielu zwierząt tej grupy stwierdzono utkanie dojrzałej uwapnionej kości gąbczastej zlokalizowanej w delikatnej luźnej tkance łącznej. Natomiast u innych zwierząt dojrzałe beleczki kostne znajdowały się w bogatokomórkowym szpiku kostnym zawierającym pojedyncze megakariocyty (RYS. 2). W teście tkance spostrzegano liczne drobne naczynia wło-

gested for the matrices of new carbon-organic composites. Epoxy resin polymer belonging to the group of thermosetting materials was used in the current experiment.

The aim of the study was to evaluate the usefulness of carbon-epoxy resin composite in bone uniting. Special attention was paid to the bonding of the implant with the bone in the period of growth. The implant material and the adjacent tissues were observed for the presence of abrasion debris from unreacted monomers or toxic additives.

Materials and methods

Six rabbits of mixed breed in the period of bone growth, weighing not more than 2500 g were used in the experiment. Material subjected to histopathological evaluation was carbon -epoxy resin composite, coated with a layer of hydroxyapatite /C-ep-Hap implant/. The material implanted to the marrow cavity together with the neighbouring bone tissue was histopathologically evaluated after 4, 14, 18, 20 and 22 weeks.

The origin of the animals used in the experiment, the place of their stay as well as the preparation method of samples for the histopathological evaluation were presented in details in earlier publications.

Results

Four weeks after implantation the deposits of carbon, consisting of shortened fibres built in the hyaline cartilage near the stem were observed. At the same time free fragments of epoxy resin were not found. The cartilage itself showed the features of ground substance deliquescence. The presence of hyaline cartilage may suggest cartilaginous metaplasia of the bone tissue frequently encountered in experimental animals.

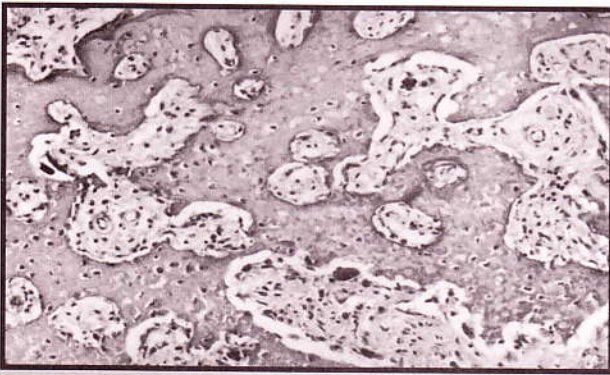
Near the carbon stem, there was spongy bone with the features of resorption manifested by sparse osteoclasts and single fragments of short carbon fibres (FIG. 1).

After fourteen weeks, tiny oval bone trabeculas at a stage of ongoing restoration were observed in the neighbourhood of carbon stem. Chains of osteoblasts covered bone trabeculas. Numerous, enlarged blood vessels were filled with red blood cells. Sparse tiny fragments of carbon were found on the edges of the described structures.

Peripheral thin bone trabeculas were fully developed. Single osteoclasts localised at some distance from the trabecula were the only indication of the completed resorption process. Moreover, mature calcified spongy bone was found in a delicate loose connective tissue in many animals of this group. In other animals, however, mature bone trabeculas were observed in the cell-rich bone marrow, containing single megakariocytes (FIG. 2). In the same tissue there were numerous tiny capillaries filled with red blood cells.

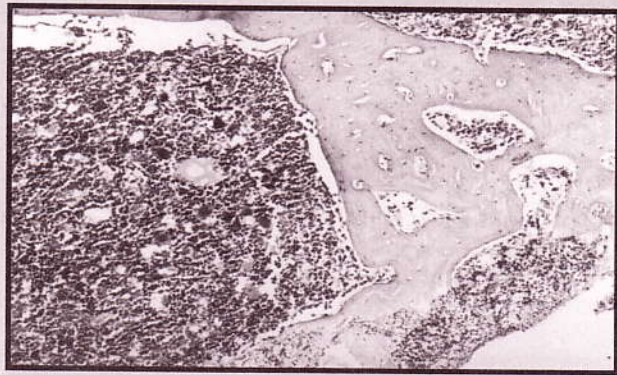
Only in single animals, on the surface of mature bone trabeculas with properly localised osteocytes, shortened carbon fibres in the form of clumped conglomerates (FIG. 3). In both described groups the presence of epoxy resin was not stated, which may suggest its complete resorption. There was no evidence of gigantocellular reaction or cicatricial changes, either.

In the group of animals after twenty-one weeks of observation, in the nearest neighbourhood of carbon stem, there were numerous bone trabeculas. They contained osteocytes surrounded by growing osteoblasts that formed thickened structures. The osteoid trabeculas tended to merge and form fissure-like intertrabecular spaces. Single osteoclasts found there, suggested that the resorption process



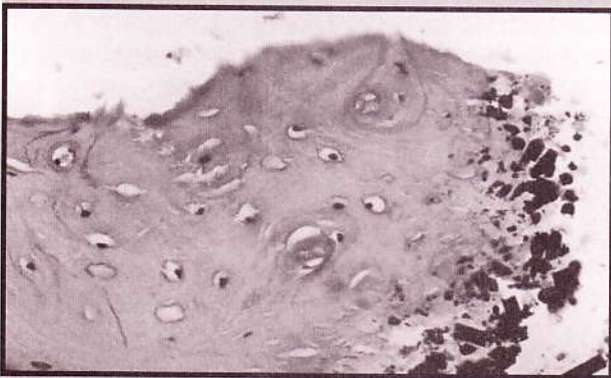
RYS. 1. 3 tygodnie-kości gąbczasta z cechami resorpcji. (H&E, 200x).

FIG. 1. 3 weeks - spongy bone with features of resorption (H&E, 200x).



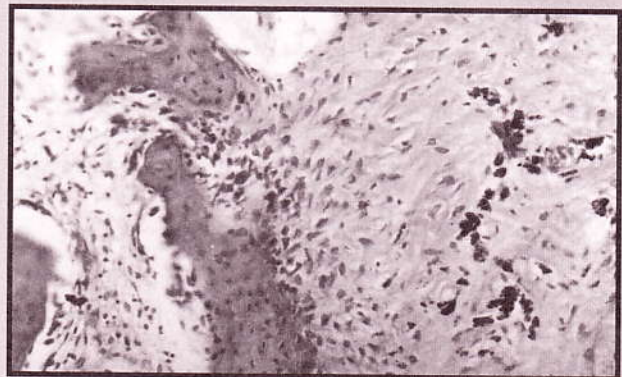
RYS. 2. 12 tygodni-dojrzałe beleczki kostne w szpiku kostnym zawierającym pojedyncze megakariocyty (H&E, 100x).

FIG. 2. 12 weeks-mature bony trabeculae in bone marrow, containing single megakaryocytes (H&E, 100x).



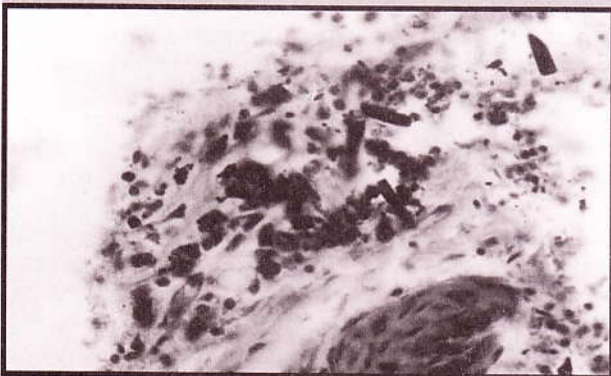
RYS.3. 12 tygodni-zbrylone konglomeraty włókien węglowych na powierzchni beleczki kostnej (H&E, 400x).

FIG.3. 12 weeks - clumped conglomerats of carbon fibres on the surface of bony trabeculae (H&E, 400x).



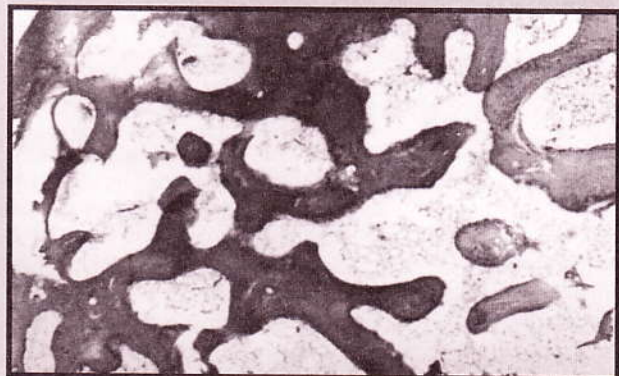
RYS.4. 21 tydzień - w sąsiedztwie beleczek kostnych tkanka łączna włóknista oraz resztki zbrylonych włókien węglowych (H&E, 200x).

FIG.4. 21 weeks - connective fibrous tissue and remains of clumped carbon fibres in neighbourhood of bony trabeculae (H&E, 200x).



RYS. 5. 21 tydzień-resztki żywicy epoksydowej otoczone zbrylonymi fragmentami włókien węglowych (H&E, 400x).

FIG. 5. 21 weeks - remains of epoxy resin surrounding by clumped carbon fibres (H&E, 400x).



RYS. 6. 21 tydzień-siatkowata struktura dojrzałej kości gąbczastej bez cech aktywności komórkowej (H&E, 40x).

FIG. 6. 21 weeks - net structured of mature spongy osseous tissue, with no cellular activity (H&E, 40x).

Tylko u pojedynczych zwierząt znaleziono na powierzchni dojrzałych beleczek kostnych zawierających prawidłowo zlokalizowane osteocyty obfite złoże znacznie skróconych włókien węglowych tworzących zbrylone konglomeraty (RYS. 3). W obydwu opisywanych grupach czasowych nie stwierdzono obecności żywicy epoksydowej, co może sugerować całkowitą resorpcję tej substancji. Nie wywoływała ona również odczynu olbrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych.

W grupie zwierząt po 21 tygodniach obserwacji w najbliższym sąsiedztwie trzpienia węglowego utkanie złożone było z licznych beleczek kostnych. Zawierały one osteocyty obrzeżone rozrastającymi się osteoblastami tworzącymi nawarstwiający się struktury. Belecжки osteoidu wykazywały tendencję do zlewania się i powstawania szczelinowatych przestrzeni międzybeleczkowych. W nich występowały pojedyncze osteoklasty, co wskazywało na niezakończony jeszcze proces resorpcji. W bezpośrednim sąsiedztwie beleczek kostnych znajdowała się tkanka łączna włóknista okostnej zawierająca nieliczne resztki zbrylonych włókien węglowych, świadczące o daleko posuniętej biodegradacji (RYS. 4). W innych natomiast miejscach, w pobliżu aktywnej odbudowy beleczek kostnych znajdowały się jedynie skupiska skróconych włókien węglowych. Złoże węglowe obserwowano również w szczelinach włóknistej tkanki łącznej okostnej, które wykazywały znacznie większy stopień zbrylenia aż do pojawienia się struktur pyłowych. W tych miejscach występowały dość liczne poszerzone naczynia krwionośne wypełnione krwinkami czerwonymi. W jednym miejscu znaleziono jasnobrazową pozostałość po żywicy epoksydowej o charakterze homogenym, znajdującą się w grupie zbrylonych resztek włókien węglowych. W jej otoczeniu nie stwierdzono żadnego odczynu typu "ciała obcego" (RYS. 5).

W obserwowanej grupie znaleziono niewielkie resztki obecności wszczepu kompozytu węglowego, wykazujące daleko posunięty proces biodegradacji o charakterze zbrylonych, rozdrobnionych struktur. Tylko miejscami w utkaniu kości gąbczastej, w przestrzeniach międzybeleczkowych, występowały nieliczne fragmenty znacznie skróconych włókien węglowych. W dalszej odległości od trzpienia węglowego wytworzyła się dojrzała gąbczasta tkanka kostna tworząca siatkowatą strukturę, w której nie spostrzegano aktywności komórek kostnych (RYS. 6).

W badanych narządach wewnętrznych /mózg, płuca, nerki, wątroba, śledziona/ nie wykazano zmian związanych z przebiegiem doświadczenia. Nie znaleziono mikroskopowo fragmentów stosowanego materiału w doświadczeniu.

Omówienie i dyskusja

Pomimo wielu niepodważalnych zalet włókien węglowych szybko okazało się, że charakteryzują się one także dużą kruchością, łamliwością i tendencją do fragmentacji [1, 2, 3]. Problemy te znacznie słabiej manifestują się, jeżeli włókno węglowe zostanie wprowadzone do odpowiedniej osnowy. Kompozyty o osnowach organicznych stanowią więc nową generację materiałów stosowanych do implantacji. Dzięki połączeniu z włóknem węglowym uzyskują odpowiednią elastyczność, zwiększoną wytrzymałość i przedłużony okres fragmentacji.

W prezentowanych wynikach eksperymentu posłużono się materiałem kompozytowym węgiel-żywica epoksydowa. Chcąc poprawić trwałość połączenia kompozytu z tkanką kostną zastosowano pokrycie z materiału bioaktywnego jakim jest hydroksyapatyt [4, 6, 9, 10, 11].

Obserwacje poczynione w trakcie przebiegu doświadczenia, jak również wyniki histopatologicznej analizy wydają się być korzystne dla kompozytu węgiel-żywica epoksydowa z nałożonym na powierzchnię elektroforetycznie

trabeculas, there was fibrous connective tissue of periosteum containing some remains of clumped carbon fibres, which indicated advanced biodegradation (FIG. 4). On the other hand, at the places of active restoration of bone trabeculas, only clusters of shortened carbon fibres were found. Carbon deposits, observed also inside the fissures of fibrous connective tissue of periosteum, underwent more significant clumping and dusting. At these places, quite numerous extended blood vessels filled with red blood cells were also found. At one place, a light brown homogeneous residue of epoxy resin was noticed within the clumped remains of carbon fibres. In the vicinity there was no evidence of a foreign body reaction (FIG. 5).

In the observed group some remains of carbon composite implants were found at an advanced biodegradation stage, i.e. in the form of clumped, broken up structures. Only locally in the spongy bone, in the intertrabecular spaces, there were few fragments of markedly shortened carbon fibres. At a bigger distance from the carbon stem, mature spongy bone tissue formed a network in which no active bone cells were noted (FIG. 6).

In the examined internal organs /brain, lungs, kidneys, spleen, liver/ no changes related to the experiment were found. Also according to microscopic observations there were no traces of the material used in the experiment.

Discussion

In spite of many unquestionable advantages of carbon fibres it turned out that they are also fragile, easy to break and tend to disintegrate [1, 2, 3]. These problems are less pronounced when carbon fibre is inserted in a suitable matrix. Polymers were used as materials that improve mechanical properties of the carbon-carbon composites. Composites with organic matrices constitute a new generation of materials used for implants. Carbon fibres embedded in the polymeric matrix exhibit better flexibility, higher strength and longer process of fragmentation.

Carbon-epoxy resin composite was used in the presented experiments. To improve the stability of implant union with bone tissue, the composite was coated with a bioactive material - hydroxyapatite [4, 6, 9, 10, 11].

Observations made during the experiment as well as the results of histopathological analysis seem to be in favour of carbon-epoxy resin composite with a hydroxyapatite coating applied electrophoretically [5, 8, 10]. The material did not lose its primary advantage, i.e. transparency to x-rays. Mechanical strength of the material increased, which was stated upon its implantation to the bone tissue. On autopsy, the bones and the area around the implant did not show any release of free fragments of carbon fibres. According to histological examination, after different implantation periods the processes of resorption were observed in the bones and marrow surrounding the composite material, followed by bone restoration and formation of mature spongy bone. These processes were found more abundant deposits accompanied by progressive biodegradation of carbon implant fragments, manifested by clumping and dusting. Free carbon fragments from the surface of implanted composite stimulate the spongy bone restoration. The process may be enhanced by hydroxyapatite applied electrophoretically on the surface of composite. Our observations confirm earlier reports on the advantageous effect of hydroxyapatite coatings on the surface of metallic implant [10]. In those studies it has been stated that resorption of hydroxyapatite taking place in the area between the hydroxyapatite layer and the bone enables growth of new cells in the place of contact with the bone, leading to strong bonding [5]. In the course of experiment, metaplastic hyaline cartilage undergoing ossification was observed in the bone marrow. In the whole hydroksyapatytem [5, 8, 10]. Nadal materiał nie utracił

swojej zasadniczej zalety jaką jest jego przeźroczystość dla promieni rentgenowskich. Natomiast zwiększyła się wytrzymałość mechaniczna materiału, co zauważono w trakcie jego wszczepiania do tkanki kostnej. W trakcie oględzin kości i okolicy wszczepu nie stwierdzono znacznego uwalniania się wolnych fragmentów włókien węglowych. Histologicznie w przedstawionych okresach obserwowano w kości i szpiku otaczającym materiał kompozytowy procesy resorpcji, a następnie odbudowy kości aż do powstania dojrzałej kości gąbczastej. Tym procesom towarzyszyła postępująca biodegradacja fragmentów wszczepu węglowego aż do powstania zbrylonych struktur i ich pyłowego rozpadu. Uwolnione fragmenty węglowe z powierzchni wszczepionego kompozytu wpływają stymulująco na odnowę kości gąbczastej. Należy także upatrywać w tym procesie znacznego wpływu naniesionego elektroforetycznie hydroksyapatu na powierzchnię kompozytu. Nasze spostrzeżenia potwierdzają wcześniejsze doniesienia obserwowanych korzystnych zjawisk na powierzchni implantów metalicznych pokrytych hydroksyapatytem [10]. W tych badaniach stwierdzono w obszarze granicznym pomiędzy hydroksyapatytem i kością resorpcję hydroksyapatytu ułatwiającą narastanie nowych komórek w miejscu styku z kością, co powoduje wytworzenie mocnego wiązania [5]. W przebiegu doświadczenia obserwowano pojawienie się w szpiku kostnym obecności metaplastycznej chrząstki szklistej ulegającej kostnieniu. W trakcie przebiegu całego eksperymentu obserwowano postępującą odnowę szpiku kostnego. Należy podkreślić, że sama obecność żywicy epoksydowej nie wywoływała odczynu olbrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych.

Wnioski

1. Kompozyt węglowy z osnową polimerową zapewnia skuteczne i bezpieczne zespolenie odcinków kostnych
2. Powolna biodegradacja kompozytu węgiel-żywica epoksydowa zapewnia dokonanie się zrostu kostnego
3. Poprawę biologicznych właściwości implantów osiągnięto poprzez pokrycie powierzchni hydroksyapatytem
4. Nie obserwowano odczynu olbrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych wskutek obecności żywicy epoksydowej

experiment restoration of bone marrow was also observed. It should be stressed that the presence of epoxy resin itself did not cause gigantocellular reaction or cicatricial changes.

Conclusions

1. Carbon composite with polymer matrix enables effective and safe uniting of bone fragments.
2. Slow biodegradation of the carbon-epoxy resin composite ensures bone union.
3. Biological properties of the implant were improved by coating its surface with hydroxyapatite.
4. No gigantocellular reaction or cicatricial changes were found related to the presence of epoxy resin.

Piśmiennictwo

References

- [1] Bajor G., Szczurek Z., Sabat D.: Ocena właściwości biologicznych kompozytów węglowych oraz węgiel-żywica epoksydowa w oparciu o badania doświadczalne na królikach. Inżynieria Biomateriałów 5, 6; 1999, 35-43.
- [2] Bajor G., Błażewicz M., Bohosiewicz J., Chłopek J., Stoch A.: Badania powierzchni kompozytów węglowych pokrytych hydroksyapatytem po implantacji. Inżynieria Biomateriałów. 3, 1998, 21-27.
- [3] Biomateriały, materiały w ochronie zdrowia i środowiska. Materiały I Krajowej Konferencji, Kraków 1994 r. Ceramika 46, red. L. Stoch.
- [4] Grochowski J., Szklarczyk S., Mieżyński W., Stankiewicz D., Obruśnik A., Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Wyniki operacyjnego leczenia ubytków kości ramiennych owiec zmodyfikowanymi wszczepami HAP. Ceramika, 46, 8, 1994, 53-58.
- [5] Muller-Mai C.M., Stupp S.I., Voigt C., Gross U.: Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histology and ultrastructure of the interface. J. Biomed. Mater. Res. Vol. 29, 1995, pp. 9-18.
- [6] Sabat D., Cieślak T., Szczurek Z., Pogorzelska-Stronczak B., Zajęcki W.: Microscopic picture of guinea pigs mandible wastages healing supported by granular hydroxyapatite. Proc. of XV Europ. Congr. of Path. Copenhagen 1995.
- [7] Sarmiento A., Schaffer J., Beckerman L.: Fracture healing in rat femoral as affected by functional weight-bearing. J. Bone Joint Surgery. 1977, 59-A, 369.
- [8] Shiota T.: Healing around hydroxylapatite coated istalled with revascularized bone graft. Proc. of Congr. of JAOP, Hamburg 1992.
- [9] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny. Ceramika 46, 8, 1994, 155-158.
- [10] Stoch A., Brożek H., Rozkrut M.: Elektroforetyczne nanoszenie hydroksyapatytu na materiały implantacyjne metaliczne lub z kompozytów węglowych. Biomateriały Węglowe i Ceramiczne, Rytro 1995, 74-79.
- [11] Stoch A., Błażewicz S.: Electrodeposited hydroxyapatite coatings on carbon-carbon composites. Materiały X Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizyki Medycznej. Kraków, 15-18. IX. 1995.
- [12] Szczurek Z., Pogorzelska-Stronczak B., Sabat D., Cieślak T.: Microscopic healing picture of defects in rabbit jaw bones as influenced by carbon cloth. Proc. of XIV Congr. of Pathol., Innsbruck, 1993.

REGULACJE PRAWNE I ASPEKTY ETYCZNE W BADANIACH DOŚWIADCZALNYCH NA ZWIERZĘTACH

LESZEK SOLSKI

ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
AKADEMII MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU

Słowa kluczowe: zwierzęta doświadczalne, eksperymenty, regulacje prawne, etyka.

Zdecydowana większość biomateriałów, czy też szerzej rozumianych wyrobów medycznych, wymaga oceny biologicznej, którą przeprowadzić należy według normy EN-ISO 10993. Przeprowadzanie kolejnych etapów oceny, w wypadku uzyskiwania pozytywnych rezultatów, doprowadza w końcowym etapie do konieczności wykonania doświadczeń lub testów z wykorzystaniem żywych zwierząt.

Człowiek wykorzystuje zwierzęta do różnych celów już od zarania dziejów. Jednak to co rozumiemy jako prowadzenie badań naukowych z wykorzystaniem żywych zwierząt miało swoje początki dopiero w pierwszej połowie XIX wieku. Natomiast za pierwszy akt prawny, który w jakimś stopniu regulował przeprowadzanie badań na zwierzętach jest niewątpliwie Brytyjska ustawa przeciw okrucieństwu wobec zwierząt z 1876 roku. Już w nowszych czasach wydano podobne ustawy m. in. w USA, Kanadzie i Australii. W sierpniu 1986 roku, w Strasbourgu, 11 krajów europejskich wchodzących w skład Unii podpisało konwencję ds. ochrony zwierząt kręgowych używanych w doświadczeniu lub innych poczynaniach naukowych. Tekst tej konwencji, z pewnymi zmianami przyjęty został przez Radę Europy w listopadzie tego samego roku jako obowiązująca dyrektywa nr 86/906/EEC regulująca szczegółowo używanie żywych zwierząt do eksperymentów, badań, doświadczeń i testów. Polska tej konwencji nie podpisała.

Niektóre z zapisów tej dyrektywy zostały też wprowadzone do wymagań normatywnych. Norma ISO 10993 pod ogólnym tytułem "Biologiczna ocena wyrobów medycznych" zawiera arkusz nr 2: Animal Welfare Requirements - wymagania dotyczące dobrostanu zwierząt.

Jeszcze do niedawna jedynym aktem regulującym ogólnie pojętą ochronę zwierząt, było rozporządzenie Prezydenta RP z dnia 22 marca 1928r. Bazując na tym akcie podstawowym, jednostki badawczo-naukowe ustanawiały własne zasady postępowania ze zwierzętami doświadczalnymi. Nowa ustawa o ochronie zwierząt, nad którą prace sejmowe trwały ponad pięć lat, nosi datę 21 sierpnia 1997r. Rozdział 9 tej ustawy zatytułowany jest "Procedury doświadczalne z użyciem zwierząt" zawiera jedynie 5 artykułów (numery od 28 do 32 włącznie). Okazało się niestety, że już w momencie publikacji zapisy tego rozdziału, tylko w niewielkim stopniu są zgodne ze wspomnianą już powyżej dyrektywą unijną z listopada 1986r. (86/609/EEC). Dyrektywa ta, zawierająca 27 artykułów, w całości zajmuje się ochroną zwierząt używanych do doświadczeń i innych celów naukowych. Jednak wydana ustawa nadal obowiązuje choć jej zapisy są mało szczegółowe, a proces nowelizacji dopiero się rozpoczyna.

Komitet Badań Naukowych na podstawie wcześniej przeprowadzonej ankiety, przygotował listę placówek, które mię-

THE LEGAL REGULATIONS AND ETHICAL PROBLEMS CONCERNING THE USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS IN BIOMEDICAL RESEARCH

LESZEK SOLSKI

DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH
CHAIR AND CLINIC OF TRAUMATOLOGY AND HAND SURGERY
MEDICAL UNIVERSITY, WROCLAW

Key words: experimental animals, biological evaluation, legal regulations, ethics.

Most of the so called "biomaterials" or in a wider sense medical devices, need to undergo biological evaluation, in accordance with the European standard EN-ISO 10993. If a product or material receives positive evaluation at different stages of testing, at the final stage it has to be tested with the use of living experimental animals.

Man has been using animals for different purposes since the very beginning of his history. However, what could be regarded as conducting the investigations with the use of living animals began at the beginning of 19th century. The first regulation, which to some extent controlled experimental investigations on animals, was the British act against cruelty to animals issued in 1876. Later on similar regulations were passed in the U.S.A., Australia and Canada. In August 1986, in Strasbourg the eleven member countries of the European Community signed a convention for the protection of vertebrates used for experiments and other scientific purposes. The High European Council accepted the main issues of that convention and edited in November of the same year as an obligatory European Directive NR 86/906/EEC, which controls in details all the experimental procedures with the living animals. Poland, as yet, has not signed that convention.

Some paragraphs of this directive were incorporated in the normative standards of ISO, like standard ISO 10993 "Biological evaluation of medical devices" with part 2: The animal welfare requirements.

Until very recently here in Poland the only regulation concerning all animal issues was the directive of the President of Polish Republic edited on 22-nd March 1928. On that basis all the institutions in question, such as universities, scientific institutes, issued their own regulations concerning the experimental procedures with the use of living animals. The new regulations were passed after 5 years of the parliamentary discussions on 21-st August 1997 and are known as Animal Protection Act. Chapter 9 of this act is devoted to "Experimental procedures with use of living animals". It consists of only 5 articles (nos. 28 to 32 incl.). Unfortunately, very shortly afterwards it was clearly visible that already at the moment of issuing most of the articles of that specific Chapter were only to a small extent consistent

dzy innymi prowadzą badania, doświadczenia czy testy na żywych zwierzętach. W oparciu o te dane wydane zostało rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 17 listopada 1999 r., w sprawie wykazu placówek w których dopuszcza się przeprowadzanie eksperymentów i testów na żywych zwierzętach. Lista ta obejmuje 85 różnego rodzaju placówek, w tym uczelnie wyższe (uniwersytety, akademie medyczne), instytuty podlegające PAN, a także resortowe jednostki badawcze.

Na podstawie zapisów ustawy o ochronie zwierząt wydane zostało też rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 21 kwietnia 1999 roku w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach. Korzystając z zapisów tego rozporządzenia przewodniczący KBN powołał 15-osobową, Krajową Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach, która rozpoczęła prace we wrześniu 1999r. W czerwcu 2000 roku, Komisja Krajowa ustaliła składy osobowe i zasięgi działania 17 komisji lokalnych na terenie całego kraju. We wrześniu 2000 roku Komisja Krajowa zatwierdziła formularze dwóch podstawowych wniosków, jakie należy wypełnić zwracając się o opinię wykonania badań czy eksperymentów na zwierzętach. Ustalono też zostały podstawowe zasady rozpatrywania tych wniosków i wydawania opinii o dopuszczalności wykonywania testów oraz badań na zwierzętach lub ich wykorzystania do celów dydaktycznych. Jak na razie, wyżej wymienione akty, pozostają jedynymi regulacjami prawnymi obowiązującymi w zakresie szeroko pojętych badań doświadczalnych na zwierzętach. Należy tu też zwrócić uwagę, na zdecydowany brak logiki nomenklaturowej, albowiem przy każdej Akademii Medycznej, rozporządzeniem Ministra Zdrowia powołano Komisje Bioetyczne, których zadaniem jest opiniowanie i wydawanie zezwoleń na prowadzenie badań klinicznych na ludziach.

Wstępny projekt Krajowej Komisji zakładał wprowadzenie aż 4 wersji formularzy wnioskowych, ale ostatecznie zaakceptowano jedynie dwa. Jeden wniosek odnosi się do wykonywania doświadczeń i testów na żywych zwierzętach, podczas gdy drugi dotyczy jedynie wykorzystania żywych zwierząt do celów dydaktycznych. Komisja Krajowa wyraźnie rozróżnia tu dwa pojęcia: "doświadczenie" i "test". Przez test należy rozumieć poddanie zwierzęcia działaniu czynnika wyłącznie dla celów praktycznych czy jak to określono "pozanaukowych" - tu znajdują się więc wszystkie badania na przykład gotowych produktów kosmetycznych. Natomiast doświadczenie zdefiniowane jest jako działanie podejmowane w celach naukowych. Definicje te wydają się być dość dyskusyjne i można się zastanawiać czy takie rozróżnienie ma jakiegokolwiek znaczenie praktyczne.

Komisja Krajowa wprowadziła też zdecydowany podział testów i doświadczeń wykonywanych na zwierzętach na 5 grup procedur o różnych stopniach inwazyjności. Każdy, kto przystępuje do planowania badań z wykorzystaniem zwierząt musi zapoznać się szczegółowo ze wszystkimi stopniami inwazyjności procedur i we wniosku odpowiednio je zakwalifikować i uzasadnić. Najwyższy stopień inwazyjności określony został jako "X" i obejmuje on procedury niedopuszczalne, takie na przykład jak unieruchamianie zwierząt bez znieczulenia czy też doprowadzania do śmierci przez głodzenie lub podawanie trucizn. Szczególnie trzeba też zwrócić uwagę na fakt, że uśmiercenie zwierzęcia dopuszczalnymi sposobami zaliczone zostało do procedur mniej inwazyjnych o stopniu 2, podczas gdy drobne zabiegi chirurgiczne przeprowadzane w znieczuleniu uznano za procedury o 3 stopniu inwazyjności. Ma to swoje uzasadnienie w szczególności do zwierząt o wyższym poziomie organizacji centralnego systemu nerwowego (ssaki, ptaki). Jednocześnie podkreślić trzeba, że humanitarne uśmiercenie zwierzęcia jest jednym z warunków dopuszczalności

with the above-mentioned EU directive of November 1986 (86/609/EEC). The directive itself consists of 27 broad articles concerning all the aspects of using animals for scientific, experimental and educational purposes. Nonetheless, our regulatory act is still in force, however the articles are not quite understandable. This act should be corrected as soon as possible but it will take again some time.

The State Committee for Scientific Research (KBN) on the basis of earlier conducted inquiry, prepared a list of institutions where the living animals are used for different purposes, i.e. for experiments, tests or education. This list, signed by the Prime Minister was issued as the government directive in November 1999. The full list consists of 85 different institutions from high schools (medical academies, universities), through independent scientific institutes to commercial laboratories.

On the basis of the above-mentioned general law concerning the protection of animals, in April 1999 the government directive was issued relating to The National Ethical Committee for Experiments on Animals and Local Ethical Committees for Experiments on Animals. According to this directive the State Committee for Scientific Research (KBN) appointed 15 members of The National Ethical Committee. One third of the members of that committee were to be chosen from a non-government organisation, which dealt with the protection of animals. The Committee started to work in September 1999. Its first task was to establish the framework programme for the Local Committees. At last in June 2000 all the members of 17 Local Ethical Committees were appointed and the area of their competence was described. In September 2000 The National Ethical Committee approved two kinds of applications, which would be obligatory to fill in by every researcher or scientist willing to make some experiments on living animals and so in need to receive the opinion of the Local Ethical Committee. Guidelines on how to fill and evaluate such applications were delivered along with the criteria for the positive opinions. For the time being, as far as the experiments on living animals are concerned, these three regulatory acts are the only law in force in Poland.

At the early stage of its work The National Ethical Committee for Experiments on Animals proposed 4 different application forms. Eventually only two of them were accepted. One concerns the use of animals for experiments and/or for tests, and the second one - the use of living animals for educational purposes. As one can see The National Ethical Committee distinguishes between "experiment" and "test". "Test" is understood as a procedure not for scientific but rather practical purposes, e.g. evaluation of new cosmetics. "Experiment" is understood as a procedure with some scientific purposes. Of course, it is disputable whether such a distinction of experiments and tests is of any practical value.

The National Ethical Committee established also the invasive grades of the experiments and tests, dividing them into five categories. Every scientist or researcher planning the evaluation procedures with the use of living animals should carefully read the guidelines and in a suitable application form properly classify and justify the planned procedures. The highest grade is denoted as level X and comprises the most invasive procedures which are not allowed under any circumstances, e.g. physical immobilisation of animals without using any anaesthetics or putting them to death by starvation or poisoning. It is necessary to point out here that in general putting the animals to death by so called humanitarian methods (e.g. by dislocation of cervical vertebrae in rodents) is classified as an invasive procedure of grade 2, while the surgery procedures performed under the full anaesthesia are regarded as invasive ones, grade 3. This could be disputed, however it is well justified in regard

9

przeprowadzenia wielu doświadczeń. Mające zasadnicze znaczenie dla oceny wielu biomateriałów badania implantacyjne, jako wymagające przeprowadzenia różnego typu zabiegów chirurgicznych zaliczyć trzeba oczywiście do procedur o 3 stopniu inwazyjności.

Niestety nadal brak jest bardzo ważnych Rozporządzeń wykonawczych związanych ściśle z prowadzeniem badań naukowych z wykorzystaniem zwierząt. Artykuł 32 Ustawy o ochronie zwierząt przewiduje, że Rada Ministrów w drodze rozporządzenia ma określić:

- warunki oraz tryb wydawania i cofania uprawnień do wykonywania doświadczeń na zwierzętach oraz kwalifikacje osób kierujących doświadczeniami;
- szczegółowe warunki przeprowadzania doświadczeń na zwierzętach oraz sposób i tryb ich kontrolowania,
- warunki bytowe w hodowlach zwierząt laboratoryjnych i zwierzętarniach.

Prace nad przygotowaniem projektów tych rozporządzeń prowadzone są w Komisji Krajowej i pozostaje mieć nadzieję, że zostaną wkrótce zakończone. Zgodnie z paragrafem 41, ust.1 rozporządzenia Rady Ministrów w sprawie komisji etycznych, doświadczenia i testy na zwierzętach wykonywane na podstawie dotychczasowych przepisów mogą być kontynuowane w okresie nie dłuższym niż dwa lata od dnia wejścia w życie tego rozporządzenia. Termin ten upływa 5 maja 2001 roku.

Niedoskonałość regulacji prawnych, czy też wręcz ich brak, nie zwalniają badaczy i naukowców od obowiązku etycznego prowadzenia badań, w szczególności etycznego postępowania ze zwierzętami. Etycznego postępowania ze zwierzętami, które poddawane są doświadczeniom i testom, nie da się zadekretować żadnym przepisem czy innym choćby najsrońszym paragrafem. Każdy badacz, wykonujący eksperyment na żywym zwierzęciu jest moralnie odpowiedzialny za całość takiego doświadczenia. Odpowiedzialność ta rozpoczyna się jeszcze przed samym przystąpieniem do wykonania zaplanowanych procedur i rozciąga się nawet na warunki bytowe zwierząt w ich pomieszczeniach, na właściwe przeszkolenie personelu obsługi i nadzór nad czynnościami jakie przy zwierzętach personel ten wykonuje. Odpowiedzialność badacza dotyczy w tym samym stopniu również okresu po wykonaniu eksperymentu, gdyż przecież nie wszystkie badania kończyć się muszą śmiercią zwierzęcia.

Na szerszą skalę losem zwierząt doświadczalnych zainteresowali się dwaj brytyjscy badacze: zoolog W.M.Russell i mikrobiolog R.L.Burch dopiero w drugiej połowie lat pięćdziesiątych. W wydanej w 1959 roku książce *The Principles of Human Experimental Techniques* wyłożyli oni, znaną dziś powszechnie zasadę 3R. Odnosi się ona do planowania badań na zwierzętach ze szczególnym uwzględnieniem: zastępowania metodami *in vitro* (replacement), zmniejszaniu liczby zwierząt poddawanych eksperymentowi (reduction) oraz doskonaleniu metod badawczych na takie, które powodują mniejsze cierpienia zwierząt (refinement). Najłatwiejsza do wprowadzenia w życie stała się zasada "redukcji". Nastąpiło to dzięki powszechnemu wprowadzeniu komputerów i wielu nowych metod statystycznych. W drugiej kolejności zaakceptowano zasadę "zastępowania" (replacement), co też związane było z postępem technicznym i nowymi możliwościami badawczymi, które w ogóle pozwalały na wykluczenie z metodyki badawczej żywych zwierząt. Najtrudniejsza do wdrożenia okazała się zasada trzecia, określana z angielska jako "refinement", a sprowadzająca się do solidnego, wstępnego zaplanowania badań, tak aby maksymalnie zredukować cierpienie i stres u zwierząt doświadczalnych.

W 1999 r. J.A.Davis zaproponował podejście do badań na zwierzętach w zastosowaniu zasady 3A. Dzieli on badania na dwie zasadnicze fazy: planowania i wykonania. W fazie pierwszej za najważniejsze uznaje odpowiednie

to the level of organisation of the central nervous system especially in mammals and birds. The humanitarian methods of putting to death are also the obligatory condition for the acceptance of experiments, which eventually end with the death of animals. Because we have already commented on biomaterials or medical devices, it is worthwhile to mention that such materials need to be evaluated by implantation. This certainly requires the use of experimental animals in some surgery procedures, so the implantation must be classified as an invasive procedure, grade 3.

Unfortunately still lacking are very important government directives, which should refer to other aspects of conducting experiments on living animals. Article 32 of the Animal Protection Act of 1997 calls for at least three other government directives that should be issued:

- about the procedure of issuing and withdrawing the permissions for animal experiments, and the qualifications of staff working with experimental animals
- about the specific conditions under which the experiments on living animals can be made and the means of control;
- about the welfare requirements for animals in breeding compounds and laboratories.

The works on preparation of the drafts of these directives are still under way at The National Ethical Committee in Warsaw and it is hoped that soon they will be ready. In accordance with article 42, point 1 of the government directive on ethical committees the experiments and tests with the use of living animals are still legal if they obey the previous regulation not longer than two years from the date of the directive's publication. The deadline is 5-th May 2001.

The deficiency of legal regulations or in some cases the lack of any regulations at all, cannot free the scientists from ethical conducting of the research, especially from ethical treatment of animals in the experiments. As far as we know, the fate of the experimental animals was first taken under consideration in 1950's. In 1959 two British scientists, the zoologist W.M. Russell and microbiologist R.L. Burch published a book entitled *"The Principles of Human Experimental Techniques"*. They presented a statement, now widely known as a rule of 3R. The 3R rule refers to the use of living animals in biomedical science. It proposes a special approach to the subject, described as replacement, reduction and refinement. By definition "replacement" means that whenever and wherever it is only possible the traditional methods of evaluation with the use of living animals should be replaced by "in vitro" methods. The "reduction" - is the process of decreasing the number of animals used in research, by using more adequate and more modern statistical procedures, and "refinement" is the way of planning and conducting the experiments so that they cause less pain and/or stress in animals.

In 1999 J.A. Davis proposed to consider the experiments on animals in terms of a Triple A Approach. He thinks that all experiments using the living animals can be divided into two main phases: the planning phase and the execution phase. In the first one (planning) the most important is the proper Approach. In the second - execution phase, the "Approach" is repeatedly Assessed and Adjusted (which makes 3 A). As a result of this procedure the scientist can be quite sure that the animal stress and/or pain were eliminated or at least mitigated.

Good planning of experiments defines the variables of interest. In order to isolate and assess the specific variable, all other parameters should remain the same. Basically, the experimental design is at the risk of compromising if confusing variables are introduced through poor animal well being. These unintended consequences - either physiological or psychological or both - affect the scientific data collected and should be possibly avoided.

The 3R rule became the basis of further search for other ways of evaluation or assessment, especially in biomedical

podejście (ang. Approach) do problemu. Odpowiednio wybrane podejście skutkuje w fazie drugiej - wykonawczej, gdzie jest sukcesywnie oceniane (ang. Assess) i dostosowywane (ang. Adjust) do badań będących już w toku. Autor kładzie szczególny nacisk na prawidłowe i bardzo szczegółowe prowadzenie dokumentacji z przeprowadzanych eksperymentów i wykonywanie etapowych raportów. Nie można, zdaniem autora zasad 3A przecenić tej z pozoru żmudnej i uciążliwej papierkowej roboty, gdyż to właśnie analiza tych danych pozwala nie tylko na zmniejszeniu ilości zwierząt w eksperymencie ale także na ograniczenie procedur powodujących ból czy silny dyskomfort.

Zasada 3R stała się podstawą do poszukiwania innych sposobów badań, które dziś powszechnie znane są jako metody alternatywne. Od pierwszego ogłoszenia zasady Russella i Burcha upłynęło już ponad 40 lat i pomimo to nie udało się całkowicie wyeliminować wykorzystywania żywych zwierząt w badaniach biomedycznych. Choć w wielu wypadkach stosowanie zasady 3R doprowadziło do efektywnego zmniejszenia użycia zwierząt w eksperymentach to jednak nadal pozostają takie dziedziny, w których bez przeprowadzenia badań na zwierzętach obejść się nie można. Takie badania obejmuje właśnie biologiczna ocena wyrobów medycznych, a w szczególności w zakresie dotyczącym oceny wyrobów przeznaczonych do wprowadzenia na stałe do wnętrza organizmu ludzkiego. Ocena taka wymaga przeprowadzenia badań implantacyjnych, które mogą jedynie być wykonane na żyjących zwierzętach. W tej dziedzinie badań - jak na razie - metody alternatywne nie istnieją. Jednak zasad 3R oraz 3A nie należy absolutnie odrzucać ani też bagatelizować. Mają one za zadanie zwrócić uwagę eksperymentatorów i badaczy na stałą konieczność takiego podejścia do badań, najchętniej już w fazie planowania, które eliminowało by dyskomfort i ból zadawany zwierzętom w takim stopniu, jak to jest tylko aktualnie możliwe.

Piśmiennictwo

- [1] Anon., Alternative to animal use in research, testing and education, Office of Technology Assessment, Congress of the United States, Marcel Dekker. Inc., New York-Basel, 1988.
- [2] Bernard N.D., Kaufman S.R., Badania na zwierzętach prowadzą donikąd, 1997, Świat Nauki (Scientific American), nr 4 (68), 62-64.
- [3] Botting J.H., Morrison A.R., Badania na zwierzętach niezbędne medycynie, 1997, Świat Nauki (Scientific American), nr 4(68), 65-67.
- [4] Davis J.A., The triple A approach to ensuring animal welfare, 1999, Animal Welfare Information Center Bulletin, 10:3-4, 1-2, 20.

studies, which today are widely known as alternative methods. Russell and Burch explained their thesis of 3R approach in 1959, i.e. more than 40 years ago but since then we have not been able to absolutely eliminate the use of living animals in the biomedical research. Of course the 3R approach significantly reduced the number of living animals used, but still there are some medical evaluations in which the use of animals is not replaceable, such as for example the biological evaluation of medical devices intended for permanent contact with the human body. The assessment of such devices, according to the ISO standard, requires implantation into the animal body. So we can say that at least in this kind of assessment the alternative methods as yet are not available. However, we should not reject the rules of 3R or 3A approach. They should constantly remind the experimenters and scientists of the necessity of using our general knowledge possibly at the planning stage, to eliminate the stress and/or pain in animals.

References

- [5] Elzanowski A., The moral career of vertebrate values, w Evolutionary ethics, pr. zbior. pod red. M.H.Nitecki i D.V.Nitecki, 1993, State University of New York Press 263-276.
- [6] Kwiatkowska J., Normy etyczne i prawne, w Zwierzęta laboratoryjne. Metody hodowli i doświadczeń prac. zb. pod red. J.Brylińskiej i J.Kwiatkowskiej, 1996, Kraków, Wyd.Universitas.
- [7] Malinowska T., Regulacje prawne dotyczące eksperymentów naukowych przeprowadzanych na zwierzętach, 1998, Życie Weterynaryjne, 12: 454-457.
- [8] Malinowska T., Lekarze weterynarii wobec eutanazji zwierząt, 2000, Życie Weterynaryjne, 75(1), 2-4.
- [9] Mukerjee M., Historia badań na zwierzętach, 1997, Świat Nauki (Scientific American), nr 4(68), 68-76.
- [10] Radzikowski Cz., Ocena tzw. metod alternatywnych w badaniach biomedycznych, 1995, Polska Akademia Umiejętności: Prace Komisji Etyki Medycznej, nr 4, 17-26.
- [11] Russell, W.M.S., Burch, R.L., Principles of humane experimental technique, 1959, Charles D.Thomas, Springfield, Il.
- [12] Ślipko T., Świat zwierząt w świetle etyki, część 1, 1996, Życie Weterynaryjne, 7, 203-207.
- [13] Ślipko T., Świat zwierząt w świetle etyki, część 2, 1996, Życie Weterynaryjne, 7, 287-291.
- [14] Vetulani J., Skąd bierze się potrzeba humanitarnego traktowania zwierząt laboratoryjnych, 1995, Polska Akademia Umiejętności: Prace Komisji Etyki Medycznej, nr 4, 7-10.

WCZESNY ODCZYN TKANKOWY PO IMPLANTACJI CERAMIKI NISKOPOROWATEJ O MODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI. BADANIA DOŚWIADCZALNE

J. STANISZEWSKA-KUŚ*, B. ZBOROMIRSKA-WNUKIEWICZ**,
R. LEWANDOWSKI*, L. SOLSKI*, J. WNUKIEWICZ*, B. ŻYWICKA*

*AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU

** INSTYTUT ELEKTROTECHNIKI ODDZIAŁ TECHNOLOGII

I MATERIAŁOZNAWSTWA ELEKTROTECHNICZNEGO WE WROCŁAWIU

Streszczenie

Ocenę biogodności materiałów bioceramicznych przeprowadza się między innymi na podstawie reakcji ogólnoustrojowej i miejscowej, po implantacji w tkanki zwierząt doświadczalnych.

Celem badań jest wykazanie, że struktura fizyczna powierzchni oraz rodzaj technologii otrzymywania biomateriałów może mieć znaczenie dla określenia odczynowości tkankowej.

Badania wykonano na szczurach wszczepiając im domięśniowo trzy rodzaje ceramiki: ceramikę litą, ceramikę - litą silanowaną, ceramikę porowatą. Sekcje zwierząt przeprowadzono 7, 30, 90 dni po operacji.

Na podstawie badań patomorfologicznych przeprowadzonych w okresie wczesnym tj. do 3 miesięcy po implantacji można stwierdzić, że ceramika silanowana o modyfikowanej powierzchni i określonym, celowo otrzymywanym potencjale elektrokinetycznym zeta, wywołuje minimalny miejscowy odczyn tkankowy. Nieco bardziej nasilony odczyn tkankowy obserwowano wokół ceramiki litej. Najsilniejszą reakcję tkankową manifestującą się obfitą i długotrwałą fazą wysiękową stwierdzono wokół ceramiki porowatej.

Słowa kluczowe: biomateriały ceramiczne: lite, lite silanowane, porowate, odczyn tkankowy, badania doświadczalne.

Wprowadzenie

Podstawowym zagadnieniem zastosowania materiałów bioceramicznych jako implantów jest określenie ich biogodności. Ocenę biogodności przeprowadza się na podstawie reakcji ogólnoustrojowej i miejscowej po implantacji w tkanki. Często syntetyczne materiały przeznaczone do implantacji, pozytywnie ocenione w badaniach wstępnych in vitro, po wszczepieniu do żywego organizmu wywołują nadmierny długotrwały proces zapalny, który obniża ich biogodność [1-7].

Celem badań jest wykazanie, że struktura fizyczna powierzchni, oraz rodzaj technologii otrzymywania biomateriałów, może mieć znaczenie dla określenia odczynowości tkankowej.

EARLY TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF SURFACE-MODIFIED CERAMICS. EXPERIMENTAL STUDY

J. STANISZEWSKA-KUŚ*, B. ZBOROMIRSKA-WNUKIEWICZ**,
R. LEWANDOWSKI*, L. SOLSKI*, J. WNUKIEWICZ*, B. ŻYWICKA*

*MEDICAL ACADEMY IN WROCŁAW

**ELECTROTECHNICAL INSTITUTE, TECHNOLOGICAL UNIT AND
ELECTROTECHNICAL DEPARTMENT OF WROCŁAW TECHNICAL
UNIVERSITY

Abstract

One of the methods of evaluating the biocompatibility of ceramic materials is based on analysing local and general reactions of the organism after implantation into the tissues of experimental animals.

The main target of this study was to demonstrate that physical structure of the surface and technology of biomaterials may influence the tissue reactions.

The study made on rats, to the muscles of which three types of ceramics were implanted: solid ceramics, silanated solid ceramics and porous ceramics.

Animals were sacrificed after 7, 30, 90 days from the implantation.

On the basis of pathomorphological studies in the early period (3 months after implantation) we stated that solid ceramics, with the modified surface and certain electrokinetic potential zeta, evoked minimal local tissue reaction. A slightly more intensive tissue reaction was observed around the non-modified solid ceramics. The most intensive tissue reaction manifested by an abundant and long-lasting exudative phase was observed around the porous ceramics.

Key words: Ceramic biomaterials: solid, solid silanated, porous, tissue reaction, experimental study.

Introduction

The main issue in using bioceramic materials as implants is to properly determine their biocompatibility. The evaluation of biocompatibility is conducted on the basis of local and general reactions of the organism after the implantation into the tissue. Very often the synthetic materials designed for implants, although positively evaluated "in vitro", after being implanted into the living organism, evoke excessive long-term inflammatory process which reduces its biocompatibility [1-7].

The general target of this study was to demonstrate that physical structure of the surface and technology of biomaterials may influence the tissue reactions.

Metody badań

Badanie miejscowych odczynów tkanek miękkich po implantacji przeprowadzono na 30 szczurach, wśobnej hodowli, szczepu Wistar, w wieku około 4-6 miesięcy i wadze ok. 150-200 g.

Materiał

Próbki ceramiczne o odpowiednim kształcie, twardości i sposobie wykończenia powierzchni zostały przygotowane zgodnie z normą ISO 10993 w Instytucie Elektrotechniki we Wrocławiu. Do badań użyto trzy rodzaje ceramiki o różnej strukturze powierzchni:

- Ceramika porowata w kształcie walców o wymiarach 10 mm długości i 3 mm średnicy oraz składzie chemicznym Al_2O_3 -95%, MgO -2%, CaCO_3 -2% ze spoiwem politle-nochloru glinu wykonana metodą tradycyjną [9].

- Ceramika lita w kształcie walców o wymiarach 10 mm długości i 3 mm średnicy, o składzie chemicznym: Al_2O_3 -95%, MgO -3%, CaCO_3 -2% otrzymywana metoda żol - żel i spiekana w temperaturze 1500°C przez 30 min. [10].

- Ceramika lita silanowana o tym samym kształcie, wymiarach i składzie chemicznym co ceramika lita. Poddana obróbce silanowania dla zmodyfikowania powierzchni w celu otrzymania określonego potencjału elektrokinetycznego zwanego potencjałem zeta. Do silanowania użyto silanu Z-6020, aminopropylotriethoxilanu. Wypalone elementy ceramiki litej poddawano obróbce wstępnej, tzn. wykonywano szereg płukań do momentu uzyskania stałego pH roztworu, w którym były one zanurzone. Następnie ceramikę suszono w 120°C przez 6 godzin. Silanowanie wykonano metodą zanurzeniową w 1% roztworze silanu w izopropanolu. Po czym suszono przez 3 godziny w 60°C [8, 11].

Operacje

Zwierzęta znieczulano metodą wziewną z użyciem eteru. Wszystkie implantacje wykonywał ten sam zespół chirurgiczny w warunkach sali operacyjnej i aseptyki chirurgicznej.

Technika implantacji wszystkich próbek ceramiki była identyczna. Skórę i tkankę podskórną przecinano w linii środkowej grzbietu na długości ok. 5 cm. Lekko przesuwając skórę na stronę prawą na tępo preparowano mięśnie, a następnie implantowano 2 badane próbki, jedną na wysokości odcinka piersiowego kręgosłupa, drugą na wysokości odcinka lędźwiowego. Lekko przesuwając skórę na stronę lewą, analogicznie implantowano 2 próbki ceramiki porowatej. Mięśnie i ranę skóry zamykano pojedynczymi szwami Dexon 3/0.

Sekcje zwierząt zaplanowano po 7, 30 i 90 dniach, przeznaczając na każdy dzień sekcyny po 5 zwierząt.

Badania sekcyjne

Szczury usypiano stosując letalną dawkę eteru. Do badań patomorfologicznych pobierano wycinki tkanek miękkich wraz z implantem. Po utrwaleniu w 8% formalinie i przeprowadzeniu wycinków w sposób typowy do zatopienia w bloczki parafinowe wykonywano preparaty histologiczne barwione metodą Van Gieson i HE.

Wyniki badań

Badania makroskopowe

7 dni po operacji u wszystkich zwierząt rany skórne były suche i zagoiły się przez rychłozrost. Po odpreparowaniu skóry na grzbiecie i powierzchownej warstwy mięśni po obu stronach kręgosłupa uwidoczniły się implanty. W bezpośrednim sąsiedztwie wszczepów widoczne były mięśnie

Methods

Evaluation of local soft-tissue reactions after implantation of the ceramics was carried out on 30 rats of the Wistar breed, 4-6 months of age, and 150-200 g in weight.

Materials

Ceramic samples of an appropriate shape, hardness and surface finish were prepared in accordance with ISO 10993 in the Electrotechnical Institute in Wrocław. In this study three types of samples differing in surface structure were used:

- porous ceramics with a cylindrical shape, 10 mm long and 3 mm in diameter, chemical composition: Al_2O_3 -95%, MgO -2%, CaCO_3 -2% with aluminium polioxychloride binder prepared by a traditional method [9].

- solid ceramics with a cylindrical shape, 10 mm long and 3 mm in diameter, chemical composition: Al_2O_3 -95%, MgO -3%, CaCO_3 -2% received by a sol-gel method and sintered for 30 min at a temperature of 1500°C [10].

- silanated solid ceramics with the shape, size and chemical composition, the same as above subjected to silanation to modify the surface and to obtain a definite electrokinetic potential zeta. The silanation was carried out using silan Z-6020, aminopropyltriethoxilan. The burned elements of solid ceramics were repeatedly rinsed until a constant pH value of the solution in which they were kept was attained. Next the ceramic samples were dried at 120°C for 6 hours. Silanation was performed by dipping in a 1% solution of silan in isopropanol. After that the samples were dried for 3 hours at 60°C [8, 11].

Surgical procedures

Anaesthesia of animals was conducted by an inhalation method using ether. All implantations were carried out by the same surgical team, in the aseptic conditions.

The techniques of implantation for all the ceramic samples were the same. Skin and subcutaneous tissue incisions were made in the midline of the back on the length of 5 cm. After slight displacement of skin to the right, a blunt dissection of muscles was made and next two samples were implanted, one at the level of a thoracic part of spine, second at the level of the lumbar part. After slight displacement of skin to the left two implants of porous ceramics were inserted in the analogous way. The muscles and skin were closed with knot sutures Dexon 3-0.

The sacrifice of animals was planned 7, 30 and 90 days after the surgery with the groups of 5 animals at each period.

Post mortem procedures

Rats were sacrificed by the lethal doses of ether. For the pathomorphological studies the samples of soft tissues with the implanted ceramics were collected. After fixing in 8% formaline and routine mounting in paraffin the histological specimens were prepared and stained according to the Van Gieson and HE methods.

Results

Macroscopic observations

Seven days after the operation in all animals the wounds on skin were dry and healed per primam intentionem. After the preparation of skin on back and superficial layer of muscles on both sides of spine the implants became visible. In the direct vicinity of implants there were muscles without any macroscopic pathological changes. Surfaces of porous ceramic implants were covered with a thin transparent

grzbietu bez makroskopowych zmian patologicznych. Powierzchnie implantów z ceramiki porowatej były pokryte cienką przezroczystą błoną, przez którą przeświecała ich porowata struktura. Wytworzona tkanka wrastała w pory ceramiki i z trudnością ją można było oddzielić od powierzchni wszczepów. Pory ceramiki były wypełnione czerwono brunatnymi masami.

Obraz makroskopowy po implantacji w mięśnie grzbietu ceramiki litej i ceramiki litej silanowanej był identyczny. W bezpośrednim sąsiedztwie implantów widoczne były mięśnie grzbietu o prawidłowym rysunku bez widocznych zmian patologicznych. Powierzchnia próbek pokryta była cienką przezroczystą błoną, w której widoczne były drobne cienkościenne naczynia krwionośne. Po nacięciu torebki z łatwością można było usunąć wszczepy. Wytworzona torebka nie była związana z powierzchnią implantów.

30 dni po operacji implanty z ceramiki porowatej leżały wśród mięśni otoczone dość grubą białawą torebką, która oddzielała je od mięśni grzbietu. Wytworzona tkanka silnie wrastała w pory wszczepów. Na powierzchni torebki widoczne były cienkościenne naczynia krwionośne.

Implanty z ceramiki litej i silanowanej otoczone były przejrzystą i dość cienką torebką, w której widoczne były drobne naczynia krwionośne. Po nacięciu torebki implanty z łatwością można było usunąć.

90 dni po operacji torebka łącznotkankowa wytworzona na powierzchni ceramiki porowatej była nierównej grubości. Na jej powierzchni widoczne były naczynia krwionośne. Pory implantu wypełniała czerwona tkanka. Wytworzona torebka silnie przerastała powierzchnię ceramiki i zrywała się podczas usuwania implantów (RYS. 1). Torebka, która otaczała implanty z ceramiki litej i ceramiki silanowanej była unaczyniona i znacznie cieńsza. Z łatwością dawała się oddzielić od powierzchni implantów. Mięśnie grzbietu w pobliżu wszczepów miały kolor i rysunek prawidłowy.

Badania mikroskopowe

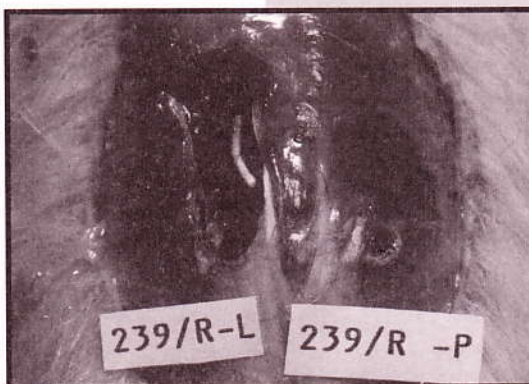
7 dni po implantacji ceramiki porowatej w mięśnie grzbietu w preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną widoczna była torebka łącznotkankowa, której szerokość wahała się od 4 do 10 przekrojów komórek mięśniowych. Od strony mięśni była ona ostro odgraniczona. W wytworzonej torebce można było wyróżnić dwie warstwy. Od strony mięśni porprzecznie prążkowanych miała ona charakter młodej tkanki łącznej z licznymi fibrocytami i fibroblastami. Od strony implantu miała charakter bogatokomórkowej tkanki, w której wyróżnić można było liczne komórki typu limfocyta, komórki plazmatyczne, pojedyncze granulocyty wielopłatowe obojętnochłonne oraz bezpostaciowe masy włókna. Ponadto widoczne były, pojedyncze pączkujące naczynia krwionośne (RYS. 2).

membrane through which the porous structure could be seen. The tissue grew into the pores of ceramic implants and it was difficult to separate. The pores were filled with a reddish-brown mass.

The macroscopic picture of the solid ceramics and solid silanated ceramics after implantation was the same. In the direct vicinity of implants the back muscles did not show any visible pathological changes. The surface of samples was covered with a thin transparent membrane with visible small thin-walled blood vessels. After incision of the capsule it was easy to separate the implants. The capsule was not connected with implant surfaces.

On 30-th day after operation the implants of porous ceramics were imbedded in the muscles and were surrounded with a quite thick white capsule, separating them from the back muscles. The tissue strongly penetrated the pores of implants. Thin walled blood vessels were visible on the capsule surface. The implants of solid ceramics and the silanated ones were surrounded with a transparent and quite thin capsule with small blood vessels in it. After incision of the capsule the implants could be easily removed.

On 90-th day after the operation the connective tissue capsule on the surface of porous ceramics had a non-uniform thickness and blood vessels were visible on its surface. The implant pores were filled with a red tissue. The capsule strongly penetrated the ceramic material and was damaged on implant removal (FIG.1). The capsule surrounding the implants made of silanated ceramics and solid ceramics was vascularised and significantly thinner. It could be easily separated from the implant surface. The muscles in the vicinity of implants had normal colour and appearance.



RYS. 1. Obraz makroskopowy 90 dni po implantacji w mięśnie grzbietu szczura. L - strona lewa ceramika silanowana, P - strona prawa ceramika porowata.

FIG. 1. Macroscopic picture 90 days after implantation into the back muscle of the rat; on the left - the silanated ceramics, on the right - the porous ceramics.



RYS. 2. Obraz mikroskopowy 7 dni po implantacji ceramiki porowatej. U dołu mięśnie poprzecznie prążkowane. do których przylega szerokie pasmo młodej tkanki łącznej (H&E, 140x).

FIG. 2. Microscopic picture 7 days after implantation of porous ceramics. In the middle - a striated muscular tissue with a wide layer of young connective tissue adhering to it (H&E, 140x).

Microscopic findings

Seven days after the implantation of porous ceramics into the back muscles of rats in the histological specimens stained with hematoxyline and eosine a connective tissue capsule was visible and its width varied between 4 and 10 muscle cell cross-sections. On the muscle side it was sharply delineated. It was possible to distinguish two layers in the capsule. On the side of striated muscular tissue there was a typical young connective tissue with a large number of fibrocytes and fibroblasts. On the implant side there was a cell-rich tissue with many cells of lymphocyte type, plasmatic cells, single neutrophilic granulocytes and amorphous fibrin masses. Moreover, single budding blood vessels were visible (FIG. 2).

In the histological specimens taken from the tissues surrounding the implant of solid ceramics, there was a layer of young cell-rich connective tissue with a non-uniform thickness and quite sharp separation from the striated muscular tissue. On the implant side the connective tissue capsule had smooth

W preparatach histologicznych wykonanych z tkanek pobranych z miejsca implantacji ceramiki litej, obserwowano pasmo młodej bogatokomórkowej tkanki łącznej o nierównej grubości, dość ostro odgraniczonej od mięśni poprzecznie prążkowanych. Od strony implantu wytworzona torebka łącznotkankowa miała gładką powierzchnię i pokryta była komórkami o spłaszczonych jądrach.

Obraz mikroskopowy wokół implantu z ceramiki litej silanowanej charakteryzował się obecnością bardzo cienkiej równej torebki łącznotkankowej zbudowanej głównie z fibroblastów i mniej licznych fibrocytów. Szerokość opisywanego pasma łącznotkankowego nie przekraczała przekroju 3 komórek mięśniowych (RYS. 3).

30 dni po implantacji ceramiki porowatej w preparatach histologicznych w pobliżu implantów obserwowano pasmo łącznotkankowe, o bardzo nieregularnym przebiegu i o zróżnicowanej budowie komórkowej. Miejscami opisywana tkanka była cienka i zawierała przede wszystkim fibroblasty i liczne włókna klejorodne. W miejscach gdzie tkanka wnikała w pory ceramiki jej budowa była bardziej luźna, bogatokomórkowa z mniejszą ilością włókien kolagenowych a szerokość wynosiła od 6 do 7 włókien mięśniowych.

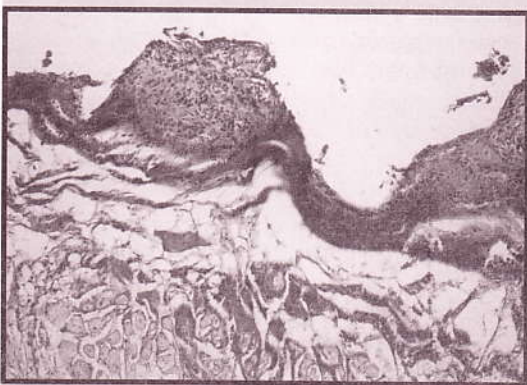
W preparatach histologicznych z mięśni wykonanych po implantacji zarówno ceramiki litej jak i litej silanowanej, obraz mikroskopowy był podobny. Torebka łącznotkankowa wytworzona wokół implantów na całej swojej długości była cienka i zbudowana przede wszystkim z fibrocytów. W preparatach barwionych metodą Van Gieson uwidoczniło się liczne czerwono barwiące się włókna klejorodne. Różnica dotyczyła jedynie grubości wytworzonej torebki łącznotkankowej. Wokół ceramiki litej silanowanej grubość tkanki łącznej wynosiła 1 szerokości komórki mięśniowej, podczas gdy szerokość torebki wytworzonej wokół ceramiki litej była dwa razy większa.

90 dni po implantacji ceramiki porowatej charakter i szerokość wytworzonej torebki łącznotkankowej był podobny jak po 30 dniach (RYS. 4). Torebka łącznotkankowa wokół ceramiki litej i litej silanowanej miała bardziej zbity i włóknisty charakter. Przeważały w niej włókna klejodajne (RYS. 5).



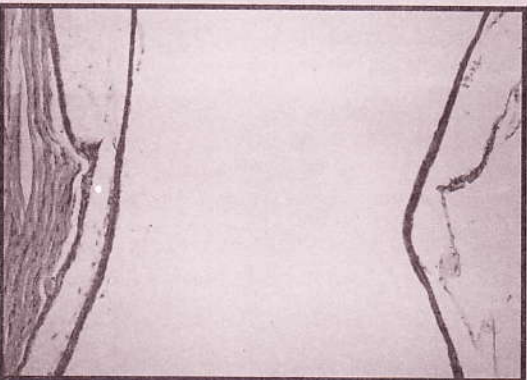
RYS. 3. Obraz mikroskopowy 7 dni po implantacji ceramiki litej silanowanej. Przestrzeń po implantacji ograniczona cienkim, równym pasmem łącznotkankowym (H&E, 140x).

FIG. 3. Microscopic picture 7 days after implantation of solid silanated ceramics. The space after the implant is delineated with a thin uniform layer of connective tissue (H&E, 140x).



RYS. 4. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji ceramiki porowatej. U dołu przestrzeń po implantacji ograniczona pasmem tkanki łącznej o niejednolitej budowie (V.Gieson, 140 x).

FIG. 4. Microscopic picture 90 days after implantation of porous ceramics. In the lower part the space after the implant is delineated with a non-uniform layer of connective tissue.



RYS. 5. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji ceramiki silanowanej. W centrum przestrzeń po implantacji ograniczona cienkim pasmem włóknistej tkanki łącznej (H&E, 140 x).

FIG. 5. Microscopic picture 90 days after implantation of silanated ceramics. In the middle the space after the implant is lined with a thin layer of fibrous connective tissue (H&E, 140x).

surface and was covered by cells with flattened nuclei. Microscopic picture around the implants made of silanated solid ceramics was characterised by the presence of a very thin uniform connective-tissue capsule, mainly composed of fibroblasts and less numerous fibrocytes. The width of the connective-tissue layer did not exceed the cross-section of three muscular cells (FIG. 3).

30 days after implantation of the porous ceramics in the histological specimens near the implants there was a layer of connective tissue with very irregular thickness and diversified cell structure. In some places the examined tissue was thin and contained first of all fibroblasts and numerous collagenous fibres. In places where the tissue penetrated the pores of ceramic implant its structure was more loose, cell-rich with less numerous collagen fibres and width 6 to 7 muscle fibres.

In the histological samples prepared from muscles after implantation of solid ceramics or silanated solid ceramics the microscopic pictures were similar. The connective tissue capsule around the implants was thin and built mainly of fibrocytes. The specimens stained according to the Van Gieson method showed numerous red-stained collagenous fibres. The only difference concerned the thickness of this connective tissue layer. Around the silanated solid ceramics its thickness was half the muscle cell width while around the solid ceramic it was twice bigger.

90 days after implantation of porous ceramics the character and thickness of the connective tissue capsule were similar as after 30 days (FIG.4). The connective tissue capsule around the solid and silanated solid ceramics was more compact and fibrous with predominant collagenous fibres (FIG. 5).

Discussion

On the basis of macroscopic and microscopic evaluation of implanted ceramics in the early period (up to 3 months) it was possible to determine the character and intensity of the tissue reaction around the implants with different surface structures. Porous ceramics evokes a much stronger inflammatory reaction divided into two phases:

- the exudative phase manifesting itself by the presence of cellofibrinous exudate, which lasts up to

Na podstawie przeprowadzonych badań implantacyjnych, makroskopowych i mikroskopowych w okresie wczesnym tj. do 3 miesięcy, można określić charakter i wielkość odczynu tkankowego, jaki występuje wokół badanych ceramiek różniących się strukturą powierzchni. Ceramika porowata wywołuje znacznie silniejszy odczyn zapalny, w którym rozróżniamy 2 fazy:

- fazę wysiękową manifestującą się występowaniem wysięku włóknikowo-komórkowego, który utrzymuje się do 3 miesięcy po implantacji w bezpośrednim sąsiedztwie ceramiki;
- fazę proliferacyjną, która doprowadza do wytworzenia się torebki łącznotkankowej oddzielającej implant od strony mięśni poprzecznie prążkowanych.

Odczyn tkankowy występujący wokół ceramiki litej charakteryzował się krótkotrwałą, mało nasiloną fazą wysiękową.

30 dni po implantacji ceramikę litą otaczało dość cienkie pasmo włóknistej tkanki łącznej. Ceramika lita silanowana o modyfikowanej powierzchni, a zatem określonym, celowo otrzymywanym potencjale elektrokinetycznym zeta, wywołuje minimalny miejscowy odczyn tkankowy bez widocznej fazy wysiękowej. 30 dni po implantacji, wszczep był otoczony bardzo cienkim, włóknistym pasmem tkanki łącznej.

Wnioski

1. Ceramika lita silanowana o określonym na powierzchni potencjale elektrokinetycznym zeta wywołuje minimalny miejscowy odczyn tkankowy.
2. Ceramika lita wywołuje lekko nasilony odczyn tkankowy.
3. Najsilniejszą reakcję tkankową, manifestującą się obfitą, długotrwałą fazą wysiękową, stwierdzono wokół ceramiki porowatej.

Podziękowania

Praca wykonana w projekcie badawczym nr 407 realizowanym w ramach badań własnych Uczelni

Piśmiennictwo

- [1] Adenis J.P., Bertin P., Lasudry J.G., Boncoeur-Martel M.P., Leboutet M.J., Robert P.Y.: Treatment of the postnucleation socket syndrome with a new hydroxyapatite tricalcium phosphate ceramic implant. *Ophtal. Plast. Surg.* 1999, 15, 4, 277-283.
- [2] Bossetti M., Ottani V., Kozel D., Raspanti D.E., Pasquale V., Ruggeri A., Cannas M.: Structural and functional macrophages alterations by ceramics of different composition. *Biomaterials* 1999, 20, 4, 363-370.
- [3] Gauthier O., Bouler J.M., Weiss P., Bosco J., Daculsi G., Aguado E.: Kinetic study of bone ingrowths and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes.
- [4] Kubo T., Sawada K., Hirakawa K., Shimizu C., Takamatsu T., Hirasawa Y.: Histocyte reaction in rabbit femurs to UHMWPE, metal, and ceramic particles in different sizes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 45, 4, 363-370.

3 months after implantation in the direct vicinity of the ceramic material,

- the proliferative phase, which leads to the formation of a connective tissue capsule separating the implant from the striated muscular tissue.

The tissue reaction around the solid ceramics is characterised by a short and not very intensive exudative phase.

30 days after implantation the solid ceramics is surrounded by a quite thin layer of fibrous connective tissue. The surface-modified silanated solid ceramics with a definite, purposely introduced electrokinetic potential zeta, evokes a minimal local tissue reaction without any visible exudative phase. 30 days after implantation, the implant is surrounded by a very thin layer of fibrous connective tissue.

Conclusions

1. Solid silanated ceramics, with a purposely-applied electrokinetic potential zeta on the surface, evokes a minimal local tissue reaction.
2. Solid ceramics evokes slightly more intensive tissue reaction.
3. The most intensive tissue reaction manifested by an abundant and long-lasting exudative phase is observed in the case of porous ceramics.

Acknowledgements

Work carried out under research project NR 407 (Medical Academy)

References

- [5] Laczka-Osyczka A., Turyna B., Dubin A., Laczka M.: Comparison of biocompatibility of gel-derived bioactive ceramics in macrophage culture conditions.
- [6] Lemons J.E.: Ceramics: past, present, and future. *Bone* 1996, 19, 1 suppl., 121S-128S.
- [7] Lu J.X., Gallur A., Anselme K., Descamps M., Thierry B., Hardouin P.: Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 3, 357-367.
- [8] Sonntag H.: *Koloidy*. PWN 1982, Rozdz. V, 137-165.
- [9] Szafran M., Laskowska J., Jaegerman Z.: Bioceramiczne materiały porowate, Szkło i Ceramika 1, 2000, 9-15.
- [10] Wnukiewicz J., Zboromiska-Wnukiewicz B.: Ocena rentgenowska ceramiki niskoporowatej otrzymywanej metodą żol-żel, wszczepionej do tkanek miękkich. Doświadczenia na zwierzętach. *Prace Naukowe Instytutu Budownictwa Politechniki Wrocławskiej. Materiały kompozytowe- właściwości wytwarzanie, zastosowanie*. Wrocław 1999, 221-227.
- [11] Zboromirska-Wnukiewicz B., Gasperowicz A., Sokołowski A.: Modyfikacja powierzchni nośników ceramicznych zwiększających immobilizację drobnoustrojów w procesach fermentacyjnych. *Postępy w Elektrotechnologii*. IV Konferencja Naukowa. Oficyna Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000, 293-296.

WŁÓKNA Z REGENEROWANEJ CHITYNY. BADANIA BIOLOGICZNE

*DANUTA PALUCH, *STANISŁAW PIELKA, **LIDIA SZOSLAND,
*JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ,
*MARIA SZYMONOWICZ, *LESZEK SOLSKI, *BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW
KATEDRY CHIRURGII URAZOWEJ I CHIRURGII REKI AKADEMII
MEDYCZNEJ WE WROCŁAWIU
** KATEDRA CHEMII FIZYCZNEJ POLIMERÓW POLITECHNIKI
ŁÓDZKIEJ

Streszczenie

Celem pracy była ocena biogodności włókien z chityny. Badania obejmowały: badania biologiczne wyciągów wodnych, badania działania cytotoksycznego, badania działania hemolitycznego, badanie śródskórnego działania drażniącego oraz badania implantacyjne.

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono działania hemolitycznego, cytotoksycznego i śródskórnego działania drażniącego. Proces wgajania przebiegał w krótkotrwałą fazę wysiękową o małym stopniu nasilenia, która około 14 dnia przechodziła w fazę proliferacyjną prowadzącą do wytworzenia torebki łącznotkankowej.

Słowa kluczowe: regenerowana chityna, cytotoksyczność, działanie drażniące, miejscowa reakcja tkankowa.

Pochodne chityny charakteryzuje się szeregiem specyficznych właściwości, takich jak: bioaktywność, odporność na sterylizację radiacyjną, biodegradowalność, zdolność do tworzenia błon i włókien, zdolność do mieszania z innymi polimerami [2, 6-11]. Wymienione właściwości pozwalają sądzić, że polimery te mogą znaleźć zastosowania medyczne jako materiały opatrunkowe, nośniki leków, implanty do kontaktu z tkanką kostną i tkankami miękkimi oraz krwią, a także jako surowce do modyfikacji innych biomateriałów.

Celem badań była ocena biologiczna włókien z regenerowanej chityny oraz ich przydatność do zastosowań medycznych. Przeprowadzono następujące badania:

- oznaczenia laboratoryjne wyciągów wodnych,
- badania działania hemolitycznego wyciągów wodnych,
- badania działania cytotoksycznego,
- badania śródskórnego działania drażniącego,
- badania miejscowej reakcji po implantacji.

Materiał

Ocenie biologicznej poddano włókna chitynowe otrzymane z włókien z dibutyrylochityny.

Włókna DBCH poddano alkalicznej obróbce 5% wodnym roztworem NaOH w temperaturze około 90°C, podczas której zachodziła reakcja hydrolizy grup estrowych i regeneracja grup hydroksylowych w makrocząsteczkach polimeru. Otrzymano włókna chitynowe bez destrukcji ich makrostruktury z wartością lepkości istotnej chityny 8.52 dL/g. Widma

BIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE REGENERATED CHITIN FIBRES

...17...

*DANUTA PALUCH, *STANISŁAW PIELKA, **LIDIA SZOSLAND,
*JOLANTA STANISZEWSKA-KUŚ,
*MARIA SZYMONOWICZ, *LESZEK SOLSKI, *BOGUSŁAWA ŻYWIĆKA

*DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS
RESEARCH
CHAIR OF TRAUMATOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, WROCŁAW
**DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY OF POLYMERS
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ

Abstract

The main purpose of this investigation was the biological evaluation of the regenerated chitin fibres and their usability in medicine. Our investigation included laboratory tests of the aqueous extracts, haemolytic effects of the aqueous extracts, the cytotoxicity tests, intracutaneous reactivity test and the local reaction after implantation.

In the conclusion we say that the fibres of regenerated chitin do not cause the haemolysis, cytotoxicity or intracutaneous irritation. The healing process of both types of fibres involved a short exudative phase, which after 14 days was followed by a proliferative phase. The latter ended with the development of a connective tissue capsule.

Key words: regenerated chitin, cytotoxicity, haemolytic effect, local tissue reaction.

Derivatives of chitin are characterised by such specific properties as: high bioactivity, good tolerance for radiative sterilisation, biocompatibility, good biodegradation and formability (fibres, foils) and miscibility with other polymers [15].

All these properties give good reasons to undertake the evaluation of dibutyrylchitin and other derivatives of chitin as biomaterials for such medical applications as dressing materials, drug carriers, implants in contact with bones, soft tissues or blood, or as modifiers of other biomaterials [2, 6-11].

The main target of this investigation was the biological evaluation of the regenerated chitin fibres and their usability in medicine. Our investigation included:

- laboratory tests of the aqueous extracts,
- haemolytic effects of the aqueous extracts,
- cytotoxicity tests,
- intracutaneous reactivity test,
- local reaction after implantation.

Material

The chitin fibres obtained from dibutyrylchitin underwent the biological evaluation.

A part of DBCH fibres was used for the preparation of chitin fibres. For this purpose the DBCH fibres were treated for 20 min with a 5% NaOH water solution at 90°C, which brought about hydrolysis of the ester groups and regeneration of hydroxyl groups in the DBCH macromolecules [20]. The product of hydrolysis was washed several times with distilled water to remove traces of the side product -

w podczerwieni, zarejestrowane na spektrometrze Perkin-Elmer 2000 FT-IR dla błonek z DBCH (1) i otrzymanej chityny regenerowanej są przedstawione na RYS. 1. Całkowity zanik w widmie 2 pasma absorpcji przy 1740 cm^{-1} , odpowiadającego drganiom w grupie karbonylowej $\text{C}=\text{O}$, obecnej w widmie DBCH, oraz pojawienie się absorpcji w obszarze 3500 cm^{-1} , odpowiadającej drganiom wodoru w grupach hydroksylowych, obecnych w chitynie, świadczy o całkowitej hydrolizie makrocząsteczek DBCH i transformacji ich w chitynę [7-11].

Przed przystąpieniem do badań włókna sterylizowano tlenkiem etylenu - w sterylizatorze gazowym.

Metody i wyniki badań

Wszystkie badania przeprowadzono zgodnie z zaleceniami PrPN-EN ISO 10993 "Badania biologiczne materiałów medycznych" [3, 4].

Oznaczenia laboratoryjne wyciągów wodnych

Wyciągi wodne przygotowano w proporcji 3 g próbki na 50 ml wody do iniekcji. Materiał wraz ze środkiem ekstrakcyjnym inkubowano w temperaturze 37°C przez 72 h.

Przeprowadzono następujące pomiary: pH, przewodność elektryczną właściwą, suchą pozostałość po odparowaniu oraz oznaczono wskaźnik wchłaniania.

Wyniki pomiarów laboratoryjnych wyciągów wodnych przedstawiono w TABELI 1. Podano średnie wartości obliczone z trzech wyciągów dla każdej próby.

Material / Material	Objętość uzyskanego wyciągu / The volume of obtained extract [ml]	Barwa / colour przezierność / clearness zapach / smell	pH	Przewodność elektryczna właściwa / Electrical conductivity [$\mu\text{S cm}^{-1}$]	Sucha pozostałość / Dry residue [g/100 cm^3]	Wskaźnik wchłaniania / Absorption index [%]
Chityna / Chitin	12	bezbarny / colourless klarowny / clear słaby / slight	6,7	16	0,0075	16
Kontrola / Control	100	bezbarny / colourless klarowny / clear brak / lack	5,9	1,3	--	--

Wszystkie oznaczane parametry były w granicach normy i były porównywalne z wartościami dla tego typu biomateriałów.

TABELA 1. Wyniki badań laboratoryjnych wyciągów wodnych.

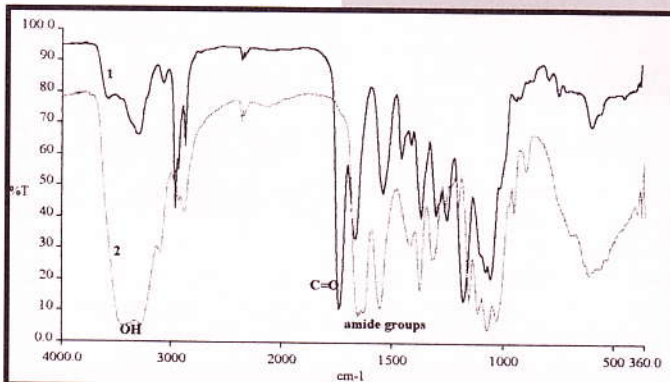
TABLE 1. The results of laboratory measurements of the aqueous extracts.

Badanie działania hemolitycznego wyciągów wodnych

Wyciągi wodne do badań działania hemolitycznego doprowadzono do izotoniczności stałym chlorkiem sodu.

Badania przeprowadzono z zastosowaniem erytrocytów ludzkich otrzymanych z krwi cytrynianowej grupy O Rh^+ . Wyciągi inkubowano z erytrocytami przez 24 godziny w cieplarni, w temperaturze 37°C . Po opadnięciu erytrocytów i po odwirowaniu (220 q/10 minut) mierzono fotometrycznie absorpcję płynu nad osadu na spektrofotometrze MARCEL s330 przy długości fali 540 nm . Jako odnośnik użyto 150 mmol/l roztworu NaCl.

Średni procent hemolizy obliczono z 3 prób. Wyciągi z



RYS. 1. Widma IR dla błonek: DBCH (1), otrzymanej z chityny krylowej, oraz chityny regenerowanej (2), otrzymanej w wyniku zasadowej hydrolizy włókien z DBCH.

FIG. 1. IR spectra of DBCH (1) obtained from krill chitin and regenerated chitin (2) obtained after alkaline treatment applied to DBCH fibres.

sodium butyrate - and excess of NaOH. The obtained chitin fibres had undamaged macrostructure and intrinsic viscosity of 8.52 dL/g (solvent - DMAC/5%LiCl, 25°C). IR spectra of the polymer films formed from the DBCH fibres (spectrum 1) and the regenerated chitin fibres (spectrum 2) are shown in FIG. 1. Infra-red spectra were recorded using the Perkin-Elmer 2000 FT-IR instrument.

Lack of absorption at 1740 cm^{-1} in spectrum 2, which is characteristic of the esters of saturated fatty acids like that in spectrum 1 for DBCH (carbonyl, $\text{C}=\text{O}$ groups), and strong absorption at 3500 cm^{-1} due to hydroxyl groups, indicates complete hydrolysis of the DBCH macromol-

ecules and their transformation into chitin [7-11].

Both types of fibres before the investigation were sterilised with gaseous ethylene oxide.

Methods and results

All the tests were carried out in accordance with the European standard PrPN-EN ISO 10993: "Biological evaluation of medical devices".

Laboratory tests of the aqueous extracts

The aqueous extracts from the tested fibres were prepared in the proportion of 3 g of fibres per 50 ml of water for injection. The samples were incubated at the temperature of 37°C for 72 hours. Our investigations included assessment of pH, electrical conductivity, dry residue and absorp-

tion index.

The results of the laboratory tests for the aqueous extracts are given in TABLE 1. They represent average values calculated from three extracts for each tested sample.

The mean values of electrical conductivity and dry residue were comparable with those obtained for biomaterials of the same type.

Assessment of haemolytic effects of the aqueous extracts

The aqueous extract was prepared in the same way as for general laboratory assessment and was made isotonic

włókien z chityny nie wykazywały działania hemolitycznego. Procent hemolizy wyniósł 0,86 i nie przekroczył wartości dopuszczalnej przez normę, czyli 1% [1].

Badanie działania cytotoksycznego

Badania przeprowadzono na referencyjnej linii komórkowej, fibroblastach mysich 3T3/Balb. Komórki były przechowywane w ciekłym azocie, w temperaturze -173°C z dodatkiem około 10% DMSO. Po rozmrożeniu komórki były dwukrotnie pasażowane przy użyciu roztworu o składzie: 0,05% trypsyny + 0,02% EDTA w PBS, o pH 7,2.

Badanie przeprowadzono metodą pośrednią po kontakcie z wyciągiem, na warstwie komórek w ilości $2,5 \times 10^5$.

Jako środka ekstrakcyjnego użyto pożywki hodowlanej z surowicą o identycznym składzie jak stosowana do hodowli macierzystej. W warunkach aseptycznych, każdy rodzaj włókien o masie 1,5 g pocięto na kawałki długości około 1cm i zalano 25 ml pożywki hodowlanej. Próby lekko wstrząsano na mikrowstrząsarce i inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C . Po tym czasie ekstrakty dodano do hodowli komórek i inkubowano w 37°C .

Ocenie poddano następujące hodowle:

- hodowla kontrolna - hodowla macierzysta z pożywką nie poddaną inkubacji,
- próba ślepa - hodowla z pożywką inkubowaną w 37°C przez 24 h,
- próba badana - hodowla z wyciągiem z włókien z chityny.

Ocenę zmian cytotoksycznych przeprowadzono po 48 h i 72 h.

Średnie wyniki badań dla trzech wyciągów z każdej próby przedstawiono w TABELI 2.

We wszystkich terminach w badanych hodowlach komórki miały prawidłowe cechy morfologiczne. Nie stwierdzono aglutynacji, wakuolizacji i lizy błon komórkowych.

by an addition of a solid NaCl.

The erythrocytes were obtained from the citrated human blood, group 0 Rh+. The aqueous extracts with the erythrocytes were incubated for 24 hours at the temperature of 37°C . After the sedimentation of erythrocytes and their centrifugation (at 220g/10 minutes) the absorption of the liquid from above the sedimented erythrocytes was measured by a photometric method at the wavelength of 540nm, using the spectrophotometer MARCEL s330. It is accepted that the tested materials do not give haemolytic effects if the mean percentage of haemolysis does not exceed 1% [1].

The mean percentage of haemolysis was calculated from 3 samples. The extracts from the chitin fibres did not show any haemolytic effects. The percentage of haemolysis was 0,86% and thus it did not exceed the value of 1% given by the standard.

Cytotoxicity

The evaluation was carried out on the referenced cell series of the mouse fibroblasts 3T3/Balb. The cells were kept in liquid nitrogen at the temperature of -173°C with a 10% addition of DMSO. After unfreezing the cells were twice subjected to passage with a solution of 0,05% trypsin + 0,02% EDTA in PBS of the general pH value of 7,2.

The assessment was made by indirect method after the contact with the extract, on the cells growing in the shape of so called "monolayer".

The culture medium with added serum, of the same content as the maternal (native) culture was used as the extract agent. Under the aseptic conditions the fibres of the 4,5 weight were cut off for the pieces of ca. 1cm long and were put into three containers at ca. 1,5g in each. These

Hodowla/ Culture	Czas obserwacji/Observation time							
	48 h				72h			
	Zmiany morfologiczne/ Morphological changes	Oddzielenie od podłoża/ Separation from the culture base [%]	Komórki/Cells		Zmiany morfologiczne/ Morphological changes	Oddzielenie od podłoża/ Separation from the culture base [%]	Komórki/Cells	
			Żywe/ Live [$\times 10^5$]	Martwe/ Death [%]			Żywe/ Live [$\times 10^5$]	Martwe/ Death [%]
Hodowla kontrolna/ Control culture	0	1-2	3,80	5	0	3	9,0	5
Próba ślepa/ Blind culture	0	1-2	3,76	4	0	3	9,4	6
Hodowla +wyciąg z chityny/ Culture with the chitin extract	0	1-2	3,73	7	0	3	7,0	5

TABELA 2. Zmiany cytotoksyczne w hodowlach fibroblastów mysich.

TABLE 2. The assessment of the cytotoxicological changes in culture of mouse fibroblast.

Po 48 godzinach zarówno w próbach badanych jak i kontrolnych liczba komórek oddzielonych od podłoża była identyczna i wynosiła 1-2%. Liczba martwych komórek w próbie z wyciągiem z chityny była większa niż w próbie ślepej i kontrolnej i wynosiła 7%. Liczba komórek żywych w hodowlach z wyciągami z badanych prób wzrosła lecz była nieco mniejsza niż w próbie kontrolnej i ślepej.

Po 72h liczba komórek oddzielonych od podłoża w próbach badanych była identyczna jak w próbie kontrolnej i ślepej i wynosiła 3%. Liczba komórek martwych w hodowli z wyciągami z chityny zmalała do 5%. Po 72h nastąpił prawie dwukrotny wzrost liczby żywych komórek w hodowlach

probes were flooded by 25ml each of the breeding culture. As the blind probe the culture medium with added serum was used. All probes were lightly shaken at the microshaker and incubated for 24h at the temperature of 37°C . After that the extracts were added to the cell culture, which later were incubated in the temperature of 37°C .

The following culture were assessed:

- as the control culture: the maternal culture medium, which was not incubated;
- as the blind probe: the culture medium incubated at 37°C for 24h;
- the tested probe: the culture with added extract of the chitin fibres.

z wyciągami z badanych prób, lecz było ich mniej niż w próbie kontrolnej i ślepej.

Badanie śródskórnego działania drażniącego

Badania przeprowadzono poprzez ocenę działania drażniącego wyciągów przygotowanych z zastosowaniem soli fizjologicznej - wyciąg polarny oraz z zastosowaniem oleju sezamowego - wyciąg niepolarny.

Wyciągi przygotowano z zachowaniem następujących parametrów:

- ilość próbek - 1,5g,
- rozdrobnienie próbek - włókna długości około 1 cm,
- środek ekstrakcyjny - 25ml soli fizjologicznej lub oleju sezamowego,
- warunki ekstrakcji - 37°C przez 72h,

Próby ślepe stanowiły sól fizjologiczna i olej sezamowy inkubowane w tych samych warunkach co wyciągi z materiałem.

Ocenę śródskórnego działania drażniącego każdej próby przeprowadzono na 3 królikach albinosach, rasy nowozelandzkiej, obojga płci, o wadze od 2,8 kg do 3,2 kg. Badanie przeprowadzono wstrzykując śródskórną po 0,2ml wyciągów polarnych i niepolarnych z badanych materiałów oraz prób kontrolnych.

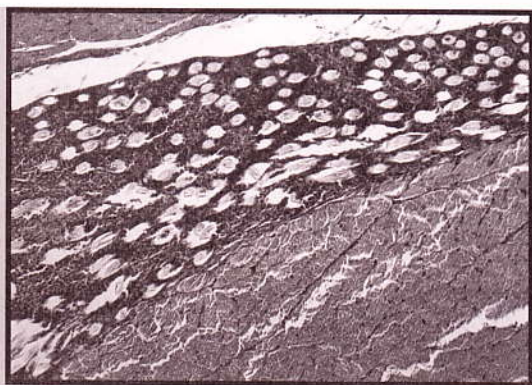
Zmiany skórne w miejscach wstrzyknięć oceniano bezpośrednio po iniekcji oraz po upływie 24, 48 i 72h.

Bezpośrednio po iniekcji wyciągów polarnych i niepolarnych z chityny u żadnego ze zwierząt nie stwierdzono zmian typu zaczerwienienia i obrzęku. Po iniekcji wyciągów polarnych z chityny nie obserwowano zmian skórnych po 24, 48 i 72h. Natomiast po iniekcji wyciągów niepolarnych z chityny stwierdzono u jednego zwierzęcia w jednym miejscu wstrzyknięcia lekkie zaczerwienienie skóry. Po 48 i 72h zmiany skórne ustąpiły.

Na podstawie uzyskanych wyników dla każdego materiału obliczono wskaźnik pierwotnego podrażnienia - WPP. Wskaźnik Pierwotnego Podrażnienia dla chityny wynosił: $1/30 = 0,033$ i był bez znaczenia.

Badanie miejscowej reakcji po implantacji

Badania przeprowadzono na 40 szczurach rasy Wistar, samcach, o masie ciała 180 g, w wieku około 2 miesięcy. Badane próby implantowano w mięśnie pośladkowe szczura [5].



RYS. 2. Obraz mikroskopowy 7 dni po implantacji włókien z chityny. Implant otoczony pasmem tkanki ziarninowej. W centrum ognisko granulocytów wielopłatowych obojętnochłonnych (Van Gieson, 140x).

FIG. 2. The microscopic view of chitin fibres 7 days after the implantation. The implanted fibres are surrounded by a layer of granulation tissue; in the middle - a focus of multilobar neutrophilic granulocytes (Van Gieson, 140x).

The assessment of the cytotoxicity was evaluated after 48 and 72h.

The means results for the three extracts of each probe are shown in the TABLE no. 2.

For all the assessment periods the cells culture under evaluation were all of proper morphological characters. There were no any visible agglutination, vacuolisation nor lysis of cells' walls.

After 48h in the tested probes as well as in control ones, the number of the cells separated from the culture's base were similar and figured 1-2%. The number of the dead cells in the probe containing the extracts from chitin was higher then in the blind probe and figured 7%. The number of the living cells in the cultures containing the extracts of the tested probes slightly increased but still was lower then the number of cells in the control and blind probes.

After 72h in the tested probes as well as in control ones, the number of the cells separated from the culture's base were similar and figured 3%. The number of the dead cells in the probe containing the extracts from chitin decreased up to 5%. After 72h the number of the living cells increased twice in the cultures containing the extracts of the tested probes, but still being lower then the number of cells in the control and blind probes.

The irritation test

For the purposes of this assessment the polar extract with saline and nonpolar extract with the sesame oil were prepared.

The prepared extracts are characterised as follows:

- the weight of the probe - 1,5 g
- the granulation of the probe - the fibres of ca. 1cm long
- the extract agent - 25 ml of saline or sesame oil
- the condition of extraction - in 37°C for 72h.

The blind probes were made of saline and sesame oil and were incubated under the same condition as for the probes with tested material.

The assessment of the intracutaneous irritation of each extracts sample was evaluated on three albino rabbits, of the New Zealand breed of both sexes, weighing between 2,8 and 3,2 kg.

The changes on the skin in the sites of injections were evaluated right after the injections were made and after 24, 48 and 72 hours.

Directly after the injection of polar and nonpolar extracts of the chitin, as far as the erythema and oedema were concerned, there were no changes noted even on single animal. After the injection of polar extracts of the chitin there were no any changes observed after 24, 48 nor 72 hours. After the injection of nonpolar extracts of the chitin one animals showed at one injection site the light erythema of the skin. This reaction retreated after 48 hours.

The Index of Primary Irritation for the chitin figured $1/30 = 0,333$ and in general assessment was of no importance.

The assessment of the local reaction after implantation

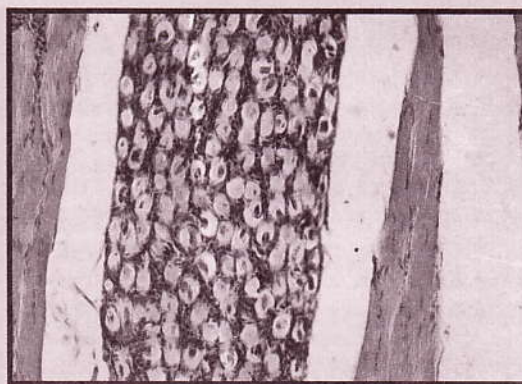
The surgery was carried out on 40 male, albino rats of Vistar breed, weighing ca. 180g and being 2 months old each. The tested fibres material was inserted parallel to the muscle fibres of the gluteal muscles using the typical surgical needle [5].

The histopathological slides were dyed by HE method. After 7 days since the implantation in the microscopic view there were seen cross sections of the implanted fibres surrounded by the fibrinous exudate reach in cell. The chitin fibres had oval shape with slightly opalescent edges. The cell-fibrin exudate visibly penetrated between the filaments of the chitin fibres, and had two distinct layers. At the edges of the implanted fibre, close to the surrounded muscles there



RYS. 3. Obraz mikroskopowy 90 dni po implantacji włókien z chityny. Pęczek włókien poprzerastany tkanką łączną włóknistą. Wokół włókien widoczne komórki olbrzymie typu ciała obcego (H&E, 140x).

FIG. 3. The microscopic view 90 days after the implantation of the chitin fibres. A bundle of fibres is overgrown by a fibrous connective tissue. Around the fibres there are giant cells of the foreign-body type (H&E, 140x).



RYS. 4. Obraz mikroskopowy 150 dni po implantacji włókien z chityny. Włókna z chityny otoczone i przerośnięte tkanką włóknistą (Van Gieson, 140x).

FIG. 4. The microscopic view 150 days after the implantation of the chitin fibres. The chitin fibres are overgrown by a connective tissue (Van Gieson, 140x).

Badania makroskopowe i mikroskopowe przeprowadzono 7, 14, 30, 90, 150 i 180 dni po implantacji.

7 i 14 dnia po implantacji, w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną widoczne były przekroje poprzeczne włókien z chityny, otoczone wysiękiem komórkowo-włóknikowym. Włókna chityny miały kształt owalny o lekko opalizujących konturach. W wysięku włóknikowo-komórkowym, który wnikał pomiędzy włókna i ograniczony był do obszaru implantu, można było wyróżnić dwie warstwy. Na obwodzie implantu w pobliżu mięśni występowały przede wszystkim fibroblasty, fibrocyty i pojedyncze jednojądrzaste komórki typu limfocyta. W centrum implantu widoczne były natomiast dość liczne rozlane ogniska granulocytów wielopłatowych obojętnochłonnych (RYS. 2).

30 dni po implantacji włókna chityny były poprzerastane bogatą komórkową tkanką łączną z przewagą fibroblastów i fibrocytów. Gdziekolwiek występowały pojedyncze komórki typu limfocyta oraz pojedyncze komórki olbrzymie typu ciała obcego. Cały pęczek włókien oddzielała od mięśni cienka - 1 szerokości włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego - tkanka łączna z licznymi włóknami klejorodnymi.

90 dni po implantacji w preparatach histologicznych barwionych metodami HE i van Gieson stwierdzono, że poszczególne włókna z chityny przerastała i otaczała tkanka łączna włóknista. W bezpośrednim sąsiedztwie włókien widoczne były liczne komórki olbrzymie typu ciała obcego (RYS. 3).

150 i 180 dni po implantacji obraz mikroskopowy był podobny. Włókna chityny o niezmiennionej ilości, gęsto ułożone, otaczała i przerastała tkanka łączna. Kolor włókien uległ zmianie z szaro-opalizującego na kolor różowo-fioletowy, co może sugerować początek resorpcji włókien z chityny (RYS. 4).

Omówienie wyników badań

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych wyciągów wodnych z chityny i dibutyrylochityny obejmujących pomiar pH, przewodności elektrycznej właściwej i suchej pozostałości po odparowaniu stwierdzono, że uzyska-

were find mainly fibroblasts, fibrocytes and single mononuclear cell of lymphocyte type. In the centre of the implanted fibre were numerous diffuse focuses of multilobulus neutrophils (FIG. 2).

The chitin fibres after 14 days since their implantation were surrounded by the layer of connective tissue, which separated the chitin itself from the transverse striated muscles.

The chitin fibres after 30 days since their implantation were overgrown by the reach-cell connective tissue with the fibroblasts and fibrocytes. Disspersly were find also cells of lymphocyte type and great cells of the foreign-body type. The fibres were separated from the muscles by the thin layer of the tissue (measured 1/4 of the muscle fibre) with numerous collagenous fibres.

In the histopathological samples which were dyed by HE and Van Gieson, after 90 days since the implantation was performed, it was observed that the single fibres of the chitin were overgrown and surrounded by the fibrous connective tissue. Very close to the fibres there were abundant great cells of the foreign body type (FIG. 3).

After 150 and 180 days since the implantation of the chitin fibres the microscopic view was similar to that one mentioned above. The chitin fibres in the same number were densely arranged and surrounded by the connective tissue. The changes in the colour of the fibres might suggest that the resorption process has just begun (FIG. 4).

Summary

On the basis of carried laboratory tests of the aqueous extracts, such as pH evaluation, electric conductivity and dry residue assessment we can stated that the obtained results are within the limits of the standards and are comparable to these given for similar kinds of medical devices, e.g. for Dexon sutures: pH - 6,10; electric conductivity - 31 μScm^{-1} ; dry residue after evaporation - 0,0014 g/100 cm^3 .

The mean percentage of hemolysis counted from the three samples made for chitin extracts was 0,86% and did not exceed the value of 1% which is accepted by the standards.

ne wyniki mieściły się w granicach normy i były porównywalne z wynikami otrzymanymi dla wyciągów wodnych dla nici chirurgicznych Dexon: pH - 6,10; przewodność elektryczna właściwa - 31 mS cm^{-1} ; sucha pozostałość po odparowaniu - $0,0014 \text{ g/100 cm}^3$.

Średni procent hemolizy obliczony z 3 prób dla wyciągów z chityny wynosił - 0,86%, a procent hemolizy dla nici Dexon-0,64 i nie przekroczył wartości dopuszczalnej przez normę.

W badaniach działania cytotoksycznego, przeprowadzonych na fibroblastach mysich, stwierdzono prawidłowe cechy morfologiczne. Nie obserwowano aglutynacji, wakuolizacji i lizy błon komórkowych. Ilość komórek oddzielonych od podłoża była identyczna jak w hodowlach kontrolnych. Nieco większa ilość komórek martwych i mniejszy przyrost komórek w hodowlach z wyciągami z chityny jest prawdopodobnie spowodowany pozostałością tlenu etylenu zastosowanego do sterylizacji włókien.

Badanie odczynowości śródskórnej wyciągów z chityny wykazało brak działania drażniącego, a wskaźnik pierwotnego podrażnienia był bez znaczenia.

W przeprowadzonych badaniach patomorfologicznych obejmujących wyniki badań makroskopowych i mikroskopowych po implantacji, stwierdzono dużego stopnia biogodność włókien z regenerowanej chityny. Proces wgajania przebiegał z krótkotrwałą fazą wysiękową o małym stopniu nasilenia, która około 14 dnia przechodziła w fazę proliferacyjną prowadzącą do wytworzenia torebki łącznotkankowej szerokości 1 średnicy implantu. W terminach późniejszych tj. 30 do 180 dni po implantacji wytworzona torebka była cienka, a jej szerokość nie przekraczała 0,5 - 1 szerokości włókna mięsnego poprzecznie prążkowanego. Odczyn tkankowy po implantacji włókien z chityny można uznać za minimalny.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że włókna z regenerowanej chityny spełniają podstawowe wymagania biologiczne dla wyrobów medycznych zawarte w PrPN-EN ISO 10993 "Biologiczna ocena wyrobów medycznych"

In the assessment of the cytotoxicity which was carried out on the mouse fibroblasts, the proper morphological character was stated. Agglutination, vacuolisation, nor cells membrane lysis were not observed. The number of cells separated from the matrix were identical as in the control cultures. The increased number of the dead cells and decreased proliferation of the cells in the cultures containing the chitin extracts, were probably due to the ethylene oxide residues, which was used for sterilisation of the fibres.

The assessment of the intracutaneous reactivity of the chitin extracts showed the lack of the irritation influence and the index of primary irritation was of no importance at all.

The pathomorphological findings, included macroscopic and microscopic assessment after implantation of chitin and dibutylchitin fibres, showed the very good biocompatibility. The healing process of both kind of fibres, included the short exudative phase, which after 14 days was followed by the proliferative phase. This last phase ended with the development of the connective tissue capsule, thickness of which was ca. 1 of the fibre diameter. After longer assessment periods (between 30 to 180 days since implantation) the connective tissue capsule around both kinds of fibres was thin, being the same thickness as single muscle fibre.

On the basis of these findings and all assessment procedure, it is stated that both kinds of fibres: chitin and dibutylchitin, fulfill the basic requirements set up for medical devices by EN ISO 10993 (Biological evaluation of medical devices).

Piśmiennictwo

- [1] Borzemska M.: Badania porównawcze metod oznaczania działania hemolitycznego wyciągów wodnych z tworzyw sztucznych. *Polimery w Med.* 8, 2, 57-61 (1978).
- [2] Paluch D., Szosland L., Kołodziej J., Staniszevska-Kuś J., Szymonowicz M., Soliski L., Żywicka B.: A biological investigation of dibutylchitin fibres. *Engineering of Biomaterials*, 7-8, 52-60, (1999).
- [3] Soliski L., Paluch D., Krzywosiński L.: Polish standardisation procedures related to biomaterials on the particular example of ISO-10993; Biological evaluation of medical devices. *Engineering of Biomaterials*, 7-8, 60-65, (1999).
- [4] Soliski L., Paluch D.: Normy w biologicznej ocenie wyrobów medycznych. *Normalizacja*, 3, 6-10, (2000).
- [5] Staniszevska-Kuś J., Rutowski R., Paluch D.: Badanie odczynu tkanek na nici chirurgiczne z zastosowaniem własnej metody punktowej. *Polimery w Med.*, 27, 1-2, 3-16, (1997).
- [6] Szosland L., Szumilewicz J.: Bioaktywne właściwości dibutyrylochityny. Postęp w chemii i zastosowaniu chityny i jej pochodnych. *Monografia*, t. III, 75-80, (1997).

References

- [7] Szosland L.: Di-O-butyrylchitin in *Chitin Handbook* ed. R.A.A.Muzzarelli, M.G.Peter, 53-60 (1997).
- [8] Szosland L.: Synthesis of highly substituted butyryl chitin in the presence of perchloric acid. *J.Bioactive and Compatible Pol.* 11, 61-71 (1996).
- [9] Szosland L., Stęplewski W.: Shear viscosity of dibutylchitin dopes and wet spinning of dibutylchitin fibres. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, ed. Polish Chitin Soc. vol. IV, 9- 15 (1998).
- [10] Szosland L., G.E.East: The dry spinning of dibutylchitin fibres. *J.Appl.Pol.Sci.* 58, 2459-2466 (1995).
- [11] Szosland L.: Alkaline hydrolysis of dibutylchitin: Kinetic and selected properties of hydrolysis products. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. 4, 76-79 (1996).

MATERIAŁY KOMPOZYTOWE Z NOWEGO BIODEGRADOWALNEGO KOPOLIMERU GLIKOLID- LAKTYD DLA CELÓW MEDYCZNYCH

ELŻBIETA PAMUŁA*, JAN CHŁOPEK*, MARTA BŁĄŻEWICZ*, KATRI
MAKINEN**, PIOTR DOBRZYŃSKI***, JANUSZ KASPERCZYK***,
MACIEJ BERO***

* AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KRAKÓW

** TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING, TAMPERE, FINLANDIA

*** CENTRUM CHEMII POLIMERÓW, POLSKA AKADEMIA NAUK, ZABRZE

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad otrzymaniem śrub i kształtek wykonanych z biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktyd, zsyntetyzowanego z użyciem niskotoksycznego związku cyrkonu, oraz z kompozytów wykonanych z tego kopolimeru wzmocnionego włóknami węglowymi. Oceniono właściwości mechaniczne i mikrostrukturalne otrzymanych materiałów a także ich zachowanie się w symulowanym środowisku biologicznym. Badania wykazały, że opracowane materiały ulegają degradacji w przeciągu kilku tygodni inkubacji w środowisku wodnym. Wprowadzenie włókien węglowych powoduje polepszenie właściwości wytrzymałościowych wyrobów i zmienia czas procesu biodegradacji.

Wprowadzenie

Ze względu na dobrą biogodność poliglikolidu i jego kopolimerów obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania tymi materiałami w codziennej praktyce klinicznej. Wytwarza się z nich biodegradowalne implanty w postaci śrub, płytek czy gwoździ chirurgicznych [1] jak i zaopatruje się nimi uszkodzenia niektórych organów wewnętrznych [2]. Kopolimery glikolidu z laktydem stosowane są również często jako nośniki leków w procesach ich kontrolowanego uwalniania [3-5]. Wspomniane kopolimery syntezuje się przeważnie na drodze otwarcia pierścienia z użyciem inicjatorów będących związkami cyny [6-8]. Wykorzystanie takich inicjatorów jest jednak co najmniej kontrowersyjne, ponieważ całkowite usunięcie tych silnie trujących związków z gotowego polimeru jest bardzo trudne i jak dowodzą badania praktycznie niemożliwe [9]. Konsekwencją tego jest powolne przedostawanie się związków cyny bezpośrednio do krwioobiegu pacjenta. Z drugiej strony wiadomo, że związki te, nawet w śladowych ilościach, są szczególnie niebezpieczne dla zdrowia dzieci oraz dla prawidłowego funkcjonowania tkanek o dużej wrażliwości na toksykację (np. tkanki mózgu, nerwów) [10].

Kopolimery laktydu z glikolidem są typowymi termoplastami dzięki czemu jest możliwe wytwarzanie z nich, np.

COMPOSITE MATERIALS FROM A NEW BIODEGRADABLE GLYCOLIDE-LACTIDE CO- POLYMER FOR MEDICAL APPLICATIONS

23
.....

ELŻBIETA PAMUŁA*, JAN CHŁOPEK*, MARTA BŁĄŻEWICZ*, KATRI
MAKINEN**, PIOTR DOBRZYŃSKI***, JANUSZ KASPERCZYK***,
MACIEJ BERO***

* UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS IN CRACOW

** TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING, TAMPERE, FINLANDIA

*** CENTRE OF POLYMERS CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCE, ZABRZE

Abstract

The paper presents the results of studies on the manufacturing of screws and other shaped elements from a biodegradable glycolide-lactide co-polymer obtained with the aid of a non-toxic compound of zirconium and from the composites consisting of the co-polymer matrix and carbon fibre reinforcement. Evaluated were the mechanical and microstructural properties of the obtained materials as well as their behaviour in a simulated biological medium. It has been stated that the investigated materials undergo degradation during several weeks of incubation in an aqueous environment. The addition of carbon fibres improves the strength of devices and affects the biodegradation time.

Introduction

Good biocompatibility of polyglycolide and its co-polymers is the reason of the observed growing interest in these materials in clinical practice. They are used as biodegradable implants shaped into screws, plates or surgical nails [1] and also as dressing for the wounds of some internal organs [2]. The glycolide-lactide co-polymers are also often used as drug carriers for a controlled drug release [3-5]. They are usually synthesised by a ring opening reaction initiated by tin compounds [6-8]. Such a procedure is rather controversial since complete removal of these strongly toxic compounds from the final product appears extremely difficult or even impossible in practice [9]. As a consequence the tin compounds are slowly released to the patient's blood. It is known on the other hand that tin compounds even in trace amounts are particularly dangerous for children and for proper functioning of tissues sensitive to intoxication, such as nerve or brain tissue [10].

The lactide-glycolide co-polymers are typical thermoplastic materials and therefore it is possible to shape them by injection moulding to obtain the articles for medical applications. However, they have relatively low mechanical parameters, which essentially limits the applications to the regions where it is not necessary that they bear significant loads. It

metodami wtrysku, wyrobów przeznaczonych dla medycyny. Jednakże kopolimery te posiadają stosunkowo słabe parametry mechaniczne, co w zasadzie ogranicza zakres stosowania ich w medycynie do przypadków, gdzie nie muszą przenosić znacznych obciążeń. Dlatego optymalną drogą poprawy ich właściwości mechanicznych wydaje się zbrojenie ich włóknami syntetycznymi, np. węglowymi.

Celem niniejszej pracy była próba otrzymania kształtek i śrub przeznaczonych dla ortopedii wykonanych z nie zawierającego toksycznych domieszek kopolimeru glikolidu z laktidem oraz z kompozytu otrzymanego z tego kopolimeru wzmocnionego włóknami węglowymi. Scharakteryzowano właściwości mechaniczne, mikrostrukturę i zachowanie się otrzymanych materiałów w symulowanym środowisku biologicznym. Syntezę kopolimeru glikolidu z L-laktidem prowadzono stosując jako inicjator związek o stosunkowo niskiej toksyczności - acetyloacetonian cyrkonu (IV) [10, 11].

Materiały i metody

Materiały

Glikolid (Purac, Holland) i L-laktyd (Purac, Holland) były oczyszczane przed użyciem poprzez rekrystalizację z suchego octanu etylu, a następnie suszone w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej. Acetyloacetonian cyrkonu (IV) (Aldrich Corp.) użyto w postaci handlowej. Kopolimeryzację prowadzono w stopie, w temperaturze 100-150°C wykorzystując w celu odgazowania stopu i zamknięcia ampuł reakcyjnych konwencjonalną linię próżniową [11]. Stosunek molowy inicjatora $Zr(acac)_4$ do monomerów wynosił 1.2×10^{-3} .

Kształtki i śruby z czystego kopolimeru i kopolimeru napełnionego włóknami węglowymi (FortafilR 201, włókna 3mm długości, Akzo Nobel) otrzymano metodą wtrysku stosując ciśnienie 12 MPa i temperatury odpowiednio 158°C i 142°C. Udział objętościowy włókien węglowych w kompozycie, V_f , wynosił 15%.

Metody

Ocena właściwości kopolimeru

Lepkość inherentną oznaczano w 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2-propanolu (HFIP) w temperaturze 25°C z wykorzystaniem lepkościomierza Ubbelohde'a. Stężenie mierzonego kopolimeru wynosiło $2g/dm^3$ roztworu. Średni lepkościowy ciężar cząsteczkowy dla kopolimerów glikolidu z L-laktydem określano wykorzystując równanie Kenley'a wcześniej sformułowane dla tego typu kopolimerów [13]

$$[\eta] = (1.67 \times 10^{-4}) M_v^{0.794}$$

Skład i mikrostrukturę łańcucha obserwowano na podstawie pomiarów protonowego rezonansu jądrowego NMR [12]. Widma 1H NMR otrzymano stosując spektrometr typu Varian Unity (300MHz) i probówki średnicy 5 mm. Jako rozpuszczalnik użyto suchy DMSO- d_6 . Badania prowadzono w temp. 100°C. Widma ^{13}C NMR (75MHz) otrzymano na tym samym urządzeniu w tych samych warunkach.

Ocena właściwości wyrobów

Porowatość otwartą, rozkład wielkości porów i ich średni rozmiar wyznaczano za pomocą porozymetru ręcznego (Porosimeter 2000, Carlo-Erba Instruments). Wytrzymałość na rozciąganie i moduł Younga kształtek wyznaczano na uniwersalnej maszynie wytrzymałościowej ZWICK 1435 z prędkością odkształcania 2mm/min. Siłę zrywającą gwint śrub wyznaczano na tym samym urządzeniu i przy tych samych warunkach.

seems that reinforcement with some synthetic fibres, e.g. carbon fibres, might greatly improve their mechanical properties.

This work was aimed at manufacturing of shaped articles and screws for orthopaedic uses from a glycolide-lactide co-polymer without any toxic additives and from the composite having the same co-polymer matrix and carbon fibre reinforcement. The obtained articles were subjected to microstructural observations and testing of the mechanical properties and behaviour in a simulated biological medium. The glycolide- L-lactide co-polymerisation was initiated with zirconium (IV) acetylacetonate having a relatively low toxicity [10, 11].

Materials and methods

Materials

Glycolide (Purac, Holland) and L-lactide (Purac, Holland) were purified by recrystallisation from dry ethyl acetate in a vacuum dryer at room temperature. Zirconium (IV) acetylacetonate (Aldrich Corp.) was used as delivered. The co-polymerisation was conducted in a melt at the temperature of 100-150°C with the use of conventional vacuum line for melt degassing and reaction ampoule closing [11]. The molar ratio of the $Zr(acac)_4$ initiator and the monomers was $1.2 \cdot 10^{-3}$. The articles from pure co-polymer and one reinforced with carbon-fibres (FortafilR 201, fibres 3 mm long, Akzo Nobel) were shaped by an injection method using the pressure of 12 MPa and temperature of 158 and 142°C, respectively. The volume fraction of carbon fibres in the composite, V_f , was 15%.

Methods

Evaluation of the properties of co-polymer

The inherent viscosity was measured in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) at 25°C by means of Ubbelohd's viscosimeter. The concentration of co-polymer was 2 g per 1 dm³ of solution. The average molecular weight of the glycolide-L-lactide co-polymer was determined from the Kenley equation previously derived for the co-polymers of this type [13]: $[\eta] = (1.67 \times 10^{-4}) M_v^{0.794}$

The composition and microstructure of the polymeric chain were followed on the basis of nuclear magnetic resonance (NMR) measurements [12]. The NMR spectra of 1H were obtained using the Varian Unity (300 MHz) spectrometer and a test tube of 5 mm in diameter. Dry DMSO- d_6 was a solvent. The measurements were performed at the temperature of 100°C. The NMR spectra of ^{13}C (75 MHz) were recorded in the same apparatus and conditions.

Evaluation of the properties of final products

Open porosity, pore size distribution and mean pore size were measured by means of a mercury porosimeter (Porosimeter 2000, Carlo-Erba Instruments). Tensile strength and Young's modulus of the shaped articles were determined on ZWICK 1435 testing machine at a strain rate 2 mm/min. Force at rupture of screw threads was found on the same device and in the same test conditions.

In vitro tests

The shaped articles, 5.4 g in mass, made of a glycolide-lactide co-polymer or a composite with carbon fibre reinforcement, were incubated in 250 ml distilled water at 37°C for 8 weeks; fresh water was supplied every seven days. The degradation progress was evaluated from the measurements of pH (pH-meter CP-315, Elmetron), conductivity

Badania in vitro

Kształtki wykonane z kopolimeru glikolid-laktyd i kompozytu z włóknem węglowym o masie 5.4 g inkubowano w 250 ml wody destylowanej w temperaturze 37°C, przez 8 tygodni, co tydzień zmieniając wodę. Postępy degradacji oceniano za pomocą badań pH (pehametr CP-315, Elmetron), przewodnictwa (konduktometr CC-315, Elmetron), zmian masy próbek i badań ultradźwiękowych (CT3 Materials Tester, Unipan Ultrasonic).

Wyniki i dyskusja

Ocena właściwości kopolimeru

Do badań wytypowano wstępnie kopolimer zawierający w swym składzie ok. 50% komonomeru glikolidu. Kopolimer o tym składzie ulega szybkiej biodegradacji oraz jest stosunkowo łatwy w przetwórstwie.

Otrzymany kopolimer charakteryzował się wysokim ciężarem cząsteczkowym, $M_v = 124000$ (lepkość inherentną, $\eta_{inh} = 1.9$ dL/g). Analiza widm 1H i ^{13}C NMR wykazała obecność silnych sygnałów (RYS.1) związanych z obecnością w łańcuchu kopolimeru sekwencji zawierających segment glikolilowy -LGL- i laktylowy -GLG- (gdzie: G- glikolil -OCH₂CO-, L- laktyl -OCH(CH₃)CO-). Sekwencje te mogą powstawać jedynie w wyniku transestryfikacji międzycząsteczkowej drugiego stopnia [12].

Analizując widma stwierdzono istnienie w łańcuchu kopolimeru wyraźnych odmiennych segmentów, długich glikolidylowych typu -GGGG- czy laktydylowych -LLLL- połączonych stosunkowo dużą ilością krótkich segmentów -GLG- i -LGL-. Średnia długość mikrobloków glikolidylowego IGG i laktydylowego ILL, w łańcuchu kopolimeru jest wyraźnie wyższa od analogicznego kopolimeru otrzymanego z użyciem inicjatorów cynowych i wynosiła około 4 jednostek glikolidylowych GG i laktydylowych LL.

Znacznie bardziej segmentowa budowa łańcucha jaką obserwujemy w otrzymanych przez nas kopolimerach, w porównaniu ze standardowym już kopolimerem glikolidu z L-laktydem otrzymanym w kopolimeryzacji prowadzonej w obecności związków cyny, determinuje nieco odmienne własności termomechaniczne badanych kopolimerów. Jest to przede wszystkim wyższy stopień krystaliczności, nieco lepsze właściwości mechaniczne oraz wyższa odporność termiczna.

(conductometer CC-315, Elmetron), mass change of the samples and ultrasonic wave rate (CT3 Materials Tester, Unipan Ultrasonic).

Results and discussion

Properties of the polymer

For first experiments a co-polymer containing about 50% glycolide co-monomer has been selected because it undergoes rapid biodegradation and is relatively easy in processing.

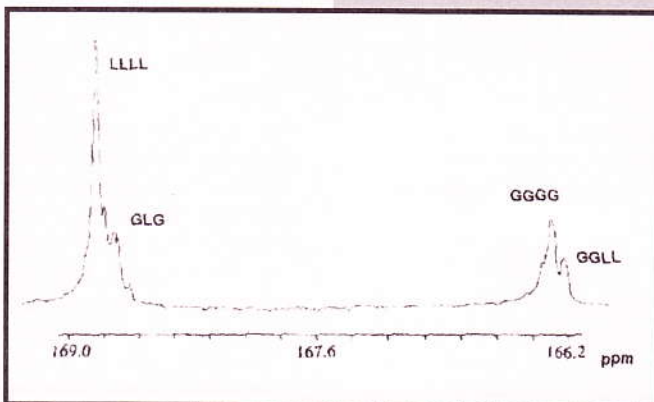
The obtained material had high molecular weight of $M_v = 124000$ (inherent viscosity $\eta_{inh} = 1.9$ dL/g). The NMR analysis of 1H and ^{13}C showed the presence of strong signals (FIG.1) related to the sequence of a glycolide segment -LGL- and a lactide segment -GLG- (where G - glycolyl: -OCH₂CO-, L - lactyl: -OCH(CH₃)CO-) in the co-polymer chain. Such sequences may be only a result of the second-order intermolecular transesterification [12].

The analysis of the spectra has led to the statement that in the polymeric chain there are distinct segments built of long glycolide-type segments, -GGGG- or similarly long lactide ones, -LLLL-, joined by relatively numerous short segments, -GLG- and -LGL-. The average lengths of the glycolide IGG and lactide ILL microblocks in the co-polymer chain are remarkably higher than in the case of an analogous polymer obtained with the use of tin initiators, and equal about 4 glycolide(GG) and lactide (LL) units.

The much more segmented structure of the chain in the co-polymers manufactured in this work, compared to the standard one obtained by co-polymerisation initiated by tin compounds, is the reason of somewhat different thermomechanical properties, such as higher crystallisation degree, a bit better mechanical properties and higher thermal resistance.

Properties of shaped articles

The established conditions of injection moulding ensured good reproducibility of the properties. Fig.2 presents screws formed from the co-polymer alone and from the composite containing a co-polymer matrix and carbon-fibre reinforcement. The mechanical tests indicate that the addition of carbon fibres improves both strength and Young's modulus (TABLE 1). Moreover, force at rupture for the composite screws is much higher than for the screws made of co-poly-



RYS. 1. Widmo ^{13}C NMR kopolimeru glikolid-laktyd otrzymanego w 100°C (region węgli karbonylowych).

FIG. 1. ^{13}C NMR spectrum of a glycolide-lactide polymer obtained at 100°C (carbonyl group region).

	σ [MPa]	E [GPa]	F [N]	ρ [g/cm ³]	P [%]
PGLA	21.3 +/- 9	1.52 +/- 0.1	412 +/- 36	1.31	1.65
PGLA+cf	75.1 +/- 17	2.77 +/- 0.05	646 +/- 34	1.30	2.17

σ - wytrzymałość na rozciąganie / tensile strength, E - moduł Younga / Young's modulus, F - siła ścinająca gwint / thread shearing force, ρ - gęstość / density, P - porowatość otwarta / open porosity

TABELA 1. Właściwości śrub wykonanych z kopolimeru glikolid-laktyd (PGLA) i kompozytu włókno węglowe - kopolimer (PGLA+cf)

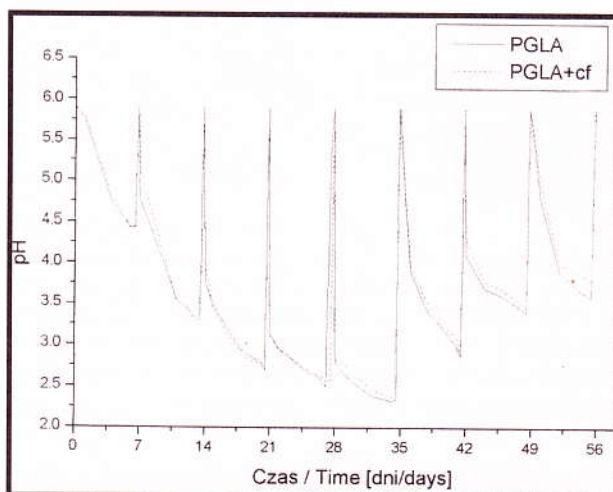
TABLE 1. Properties of screws made of a glycolide-lactide co-polymer (PGLA) and a co-polymer - carbon fibre composite (PGLA + cf)

Ocena właściwości wyrobów

Opracowane warunki wytwarzania kształtek metodą wtrysku pozwalają na otrzymywanie wyrobów o powtarzalnych właściwościach. Na rysunku 2 przedstawiono śruby formowane z samego kopolimeru i kopolimeru glikolidu z laktydem wzmocnionego włóknami węglowymi. Badania właściwości mechanicznych wykazują, że wprowadzenie włókien węglowych podwyższa zarówno wytrzymałość jak i moduł otrzymanego materiału [TABELA 1]. Ponadto siły konieczne do zniszczenia gwintu śrub kompozytowych są wyraźnie wyższe w porównaniu ze śrubami wykonanymi z czystego polimeru. Porowatość otwarta śrub wzmocnionych włóknem węglowym jest wyższa niż śrub wykonanych z czystego polimeru, co może być związane z, występowaniem granic rozdziału faz: włókno węglowe - polimer.

Badania in vitro

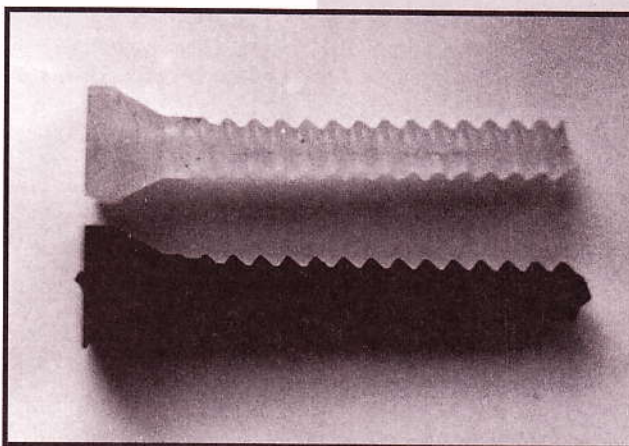
Rysunki 3 i 4 przedstawiają zależności zmian pH i przewodnictwa wody destylowanej w której zanurzono: kształtki polimerowe (PGLA) i kształtki wzmocnione włóknami wę-



RYS. 3. Zależność zmian pH od czasu inkubacji próbek PGLA i PGLA+cf w wodzie destylowanej.

FIG. 3. The pH variations on incubation of the PGLA and PGLA+cf samples in distilled water.

glowymi (PGLA+cf). Spadek pH wody i towarzyszący mu wzrost przewodnictwa świadczą o wydzielaniu do otoczenia produktów degradacji hydrolitycznej kopolimeru glikolidu z laktydem, którymi są rozpuszczalne oligomery i cząsteczki kwasu glikolowego i mlekowego. Z powyższych danych wynika, że w ciągu pierwszych dwóch tygodni do otoczenia wydzielano się stosunkowo mało produktów degradacji, a największa ich ilość jest wydzielana pomiędzy 4 a 5 tygodniem inkubacji w wodzie destylowanej. W dalszych tygodniach inkubacji ilość produktów degradacji ponownie ulega obniżeniu.



RYS. 2. Śruby do osteosyntezy wykonane z PGLA i PGLA wzmocnionego włóknem węglowym.

FIG. 2. Screws for osteosynthesis made of PGLA pure and reinforced with carbon fibres.

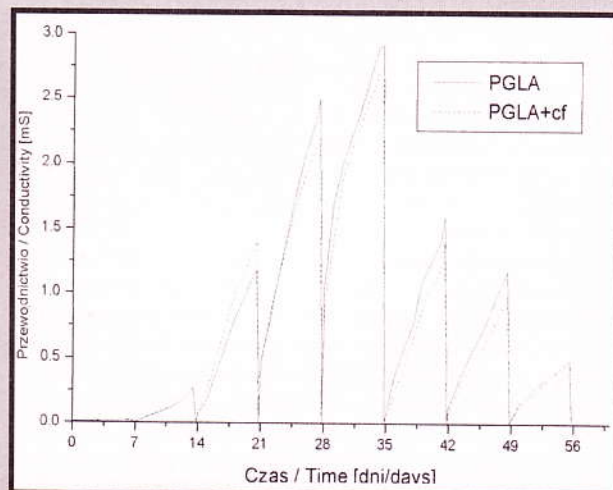
mer alone. Open porosity of the composite screws is higher than that of the pure copolymer, probably because of the appearance of a carbon fibre/polymeric matrix interface.

In vitro tests

FIGS. 3 and 4 demonstrate the variations of pH and electrical conductivity of distilled water in which PLGA and PLGA+cf samples were immersed. A decrease of pH and increase of electrical conductivity indicate that the products of hydrolytic degradation of the glycolide-lactide co-polymer are released to the environment. These products are soluble oligomers and molecules of glycolic and lactic acid. It follows from the presented results

that during the first two weeks the amount of degradation products released is relatively small. The highest amount is observed between the fourth and fifth week of incubation in the distilled water. During the subsequent weeks the amount of degradation products becomes lower again.

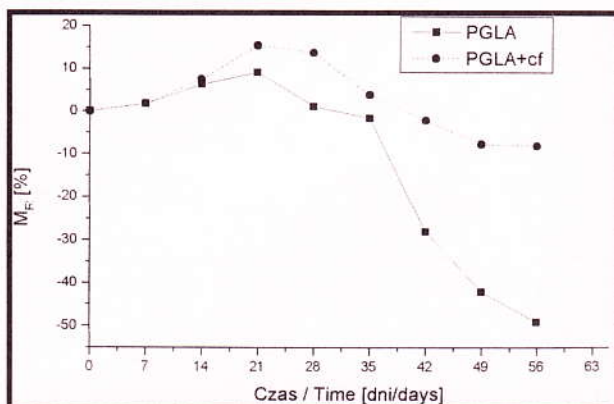
FIG. 5 shows a dependence of relative mass changes of the co-polymer and composite samples as a function of time of incubation in a water environment. In both cases the sample mass increases. This is caused by water absorption - a



RYS. 4. Zależność zmian przewodnictwa od czasu inkubacji próbek PGLA i PGLA+cf w wodzie destylowanej.

FIG. 4. The conductivity variations on incubation of the PGLA and PGLA+cf samples in distilled water.

phenomenon that occurs at the beginning of degradation of aliphatic polyesters in water and is well documented in the literature [14, 15]. The mass gain of the composite is bigger than that of pure polymer. This is probably related to the carbon fibre - polymeric matrix interfaces, which facilitate inward penetration of water. They provide fast diffusion paths for water molecules, accelerating thereby the hydrolytic degradation of the polymer. This hypothesis is confirmed by conductivity measurements (FIG. 3), which indicate a more advanced degradation of the composite compared to pure polymer during the first three weeks of experiment.



RYS. 5. Zależność względnych zmian masy próbek PGLA i PGLA+cf od czasu inkubacji w wodzie destylowanej.

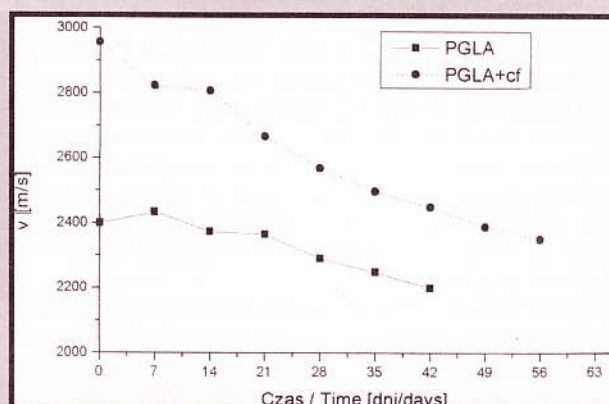
FIG. 5. The time-dependence of relative mass changes for the PGLA and PGLA+cf samples incubated in distilled water.

Rysunek 5 przedstawia zależność względnych zmian masy w funkcji czasu inkubacji w środowisku wodnym polimeru i kompozytu. W obu przypadkach obserwuje się wzrost masy próbek. Jest to spowodowane zjawiskiem absorpcji wody, które to zjawisko występuje na początku procesu degradacji poliestrów alifatycznych w środowisku wodnym i jest szeroko dokumentowane w literaturze [14, 15]. Wzrost masy kompozytu jest znacznie wyższy niż czystego polimeru. Jest to najprawdopodobniej związane z występowaniem granic międzyfazowych: włókno - polimer, które ułatwiają penetrację cząsteczek wody do wnętrza materiału. Stanowią one drogi szybkiej dyfuzji cząsteczek wody, przez co w początkowym etapie włókna przyspieszają proces degradacji hydrolytycznej polimeru. Potwierdzeniem powyższej teorii są wyniki zmian przewodnictwa [RYS. 3.] wskazujące na bardziej zaawansowany proces degradacji kompozytu w odniesieniu do czystego polimeru w pierwszych 3 tygodniach eksperymentu. Po 3 tygodniach in vitro obserwuje się spadek masy próbek wywołany wydzielaniem produktów biodegradacji do otoczenia. Największy spadek masy czystego polimeru występuje po 5 tygodniach inkubacji, czemu towarzyszy wydzielanie do otoczenia największej ilości produktów rozpadu (porównaj RYS. 3 i 4). Po 6 tygodniach inkubacji kształtka polimerowa ulega kruszeniu podczas gdy kształtka kompozytowa, dzięki obecności włókien węglowych, zachowuje swoją formę i kształt. Niższe zmiany masy kształtka kompozytowej są wynikiem obecności włókien węglowych, ($V_f = 15\%$), które same nie ulegają procesowi degradacji.

Rysunek 5 przedstawia zależność prędkości fali ultradźwiękowej analizowanych próbek: polimerowej (PGLA) i kompozytowej (PGLA+cf) od czasu inkubacji in vitro. Wyjściową próbkę kompozytową cechuje znacznie wyższa wartość prędkości fali ultradźwiękowej niż próbki polimerowej. Jest to spowodowane obecnością włókien węglowych, które charakteryzują się znacznie wyższym modułem Younga niż materiał osnowy. Większy spadek prędkości fali w kompozycie w funkcji czasu inkubacji potwierdza zjawisko katalicznego wpływu włókien węglowych na proces biodegradacji polimeru [16, 17].

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że możliwe jest formowanie metodą wtrysku kształtek i śrub przeznaczonych do osteosyntezy nie zawierających silnie trującej cyny; za-



RYS. 6. Zależność zmian prędkości fali ultradźwiękowej próbek PGLA i PGLA+cf od czasu inkubacji w wodzie destylowanej.

FIG. 6. The time-dependence of ultrasonic wave rate for the PGLA and PGLA+cf samples incubated in distilled water.

After three weeks of in vitro tests the mass of samples decreases as a result of a biodegradation-products release. The biggest mass loss of the pure polymer is observed after five weeks of incubation and it is accompanied by the biggest release of the degradation products (compare FIGS. 3 and 4). After six weeks of incubation the polymeric sample disintegrates while the composite one, owing to the presence of carbon fibres, preserves its shape. Lower mass changes of the composite sample result from the presence of carbon fibres, ($V_f = 15\%$), which themselves do not undergo any degradation.

FIG. 5 presents a dependence of the ultrasonic wave rate on incubation time for the PGLA and PGLA+cf samples tested in vitro. For the initial sample of the composite material the rate of ultrasonic wave is higher than for the polymer alone. This is due to carbon fibres, which have a much higher Young's modulus, compared to the matrix. The more significant drop of propagation rate in the composite in function of incubation time confirms the suggested catalytic effect of carbon fibres on biodegradation of the polymer [16, 17].

Conclusions

The investigations carried out in this work indicate that it is possible to produce articles with different shapes, such as screws for osteosynthesis, by an injection moulding method using both pure glycolide-lactide polymer synthesised with the aid of a $Zr(acac)_4$ initiator or a composite having the same polymeric matrix and carbon fibre reinforcement. Carbon fibres significantly improve the strength of co-polymer but at the same time they accelerate degradation of the material in an aqueous environment. This phenomenon is caused by interactions between the surface of carbon fibres and the polymeric matrix and by the presence of interfaces which provide short-circuit paths for the diffusion of water molecules and the polymer decomposition products.

The investigated materials undergo degradation in aqueous environment over the period of a few weeks, which seems sufficient for the development of bone union. However, in order to evaluate the usefulness of these materials in clinical practice, in view of the earlier observed slow-down of the degradation in the bone tissue, compared to the in vitro tests in water [18], it seems necessary to carry out the in vitro studies on experimental animals.

równy z samego kopolimeru glikolid-laktyd otrzymanego z użyciem $Zr(acac)_4$ jak i z kompozytu tego kopolimeru wzmocnionego włóknami węglowymi. Wprowadzenie włókien węglowych znacznie polepsza właściwości wytrzymałościowe kopolimeru, jednak przyspiesza proces ich degradacji w środowisku wodnym. Zjawisko to jest spowodowane oddziaływaniem pomiędzy powierzchnią włókien węglowych a osnową polimerową i obecnością granic rozdziału, które stanowią drogi szybkiej dyfuzji cząsteczek wody i produktów rozpadu kopolimeru.

Badane materiały ulegają procesowi biodegradacji w przeciągu kilku tygodni przebywania w środowisku wodnym, co wydaje się być czasem pozwalającym na uzyskanie wzrostu kostnego. Jednakże do określenia przydatności opracowanych materiałów w praktyce klinicznej, biorąc pod uwagę obserwowane wcześniej spowolnienie degradacji w tkance kostnej w porównaniu do badań prowadzonych in vitro w środowisku wodnym [18], konieczne wydaje się przeprowadzenie badań in vivo na zwierzętach doświadczalnych.

Podziękowania

Badania prowadzono w ramach projektu badawczego Komitetu Badań Naukowych nr 3 T09B 010 17

Piśmiennictwo

- [1] Leenslang J.W., Pennings A.J., R.M. Bos, Rozema F.R., *Biomaterials* 8, (1987) 70.
- [2] Grijpma D.W., Zondervan G.J., Pennings A., *J. Polym. Bull.* 25 (1991) 327.
- [3] Thies C., Formation of degradable drug-loaded microparticles by in-liquide drying processes. In: Donbrow M., editor., CRC Press, Inc. Boca Raton Ann Arbor London 1992. p. 47-71.

Acknowledgements

The work was carried out under Contract No. 3 T0(B010 17 financed by the Polish Committee for Scientific Research.

References

- [4] Buntner B., Nowak M., Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., *J. Bioactive Compatible Polymers* 11(2) (1996) 110.
- [5] Buntner B., Nowak M., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Bero M., *J. Contr. Rel.* 56 (1998) 159.
- [6] Gilding D.K., Reed A.M. *Polymer* 20 (1979) 1459.
- [7] Bezwada R.S., Jamiolkowski D.D., Lee I.Y., Agerwal V., Persivale J., Trenka-Benthin S., Erneta M., Liu S. *Biomaterials* 16(15) (1995) 1141.
- [8] Bero M., Czapla B., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., *Macromol. Chem. Phys.* 200 (1999) 911.
- [9] Schwach G., Coudane J., Engel R., Vert M. *J. Polym. Sci. Part A* 35 (1997) 3431.
- [10] Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials. Eight Edition. Levis R.J. editor, Sr. Van Nostrand Reinhold New York 1992
- [11] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., *Polym. Bull.* 42 (1999) 131.
- [12] Kasperczyk J. *Polymer* 37(2) (1996) 201.
- [13] Kenley R.A., Lee M.O., Mahoney, II, T.R., Sanders L.M. *Macromolecules* 20 (1987) 2398.
- [14] Christel T.M., Li S.M., Garreau H., Vert M., *Biomaterials* 13 (1992), 594.
- [15] Grizzi I., Garreau H., Vert M., *Biomaterials* 16 (1995), 305
- [16] Błażewicz M., Chomyszyn-Gajewska M., Paluszkiwicz Cz., *J. Molec. Struct.* 482-483 (1999), 519.
- [17] Pamula E., Błażewicz M., Paluszkiwicz C., Dobrzyński P., *Journal of Molecular Structure - in print*
- [18] Priwałowa LG., Daurowa T.T., Voronkova O.S., *Wysokomolekularnyje Sojednieniya*, A, 22(8), 1980, 1891-1894.

STUDY OF THE SURFACE PROPERTIES OF C-C COMPOSITES AS BIOMATERIALS

M. BUREŠOVÁ, K. BALÍK

INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Introduction

Carbon-carbon composites overcome many of the common problems associated with metal implants. They exhibit a relatively high strength and low modulus of elasticity, which is comparable with that of human bones [1]. Carbon-carbon composites with pores of about 40 mm in diameter can be also favourable for tissue and bone ingrowth. Their application as biomaterials is limited by cost and brittleness of matrix. The brittleness very often leads to the formation of microparticles in the tissue, which may cause inflammations around implants [2]. To prevent the release of carbon particles, the C-C composites were covered with different layers. In our work we studied the physico-chemical character

of the C-C composite surface before the application of new layers.

Materials and methods

The samples used in this study were 2-D carbon-carbon composites based on plain-woven cloth (carbon fibres Torayca T800H, Japan) and phenolic resin Umaform LE (SYNPO, Ltd., Pardubice, Czech Republic) as a matrix precursor. The cured samples were cut into 7 mm x 4 mm x 3 mm pieces and carbonised at 50°C/hr up to 1000°C in nitrogen. Three-step impregnation with phenolic resin was used. Subsequently HTT up to 2200°C in argon was applied. Pyrolytic carbon was deposited from propane in a tumbling bed reactor, at ambient pressure, at the reaction temperature 850°C. Final properties of the composites are shown in TABLE 1.

	Open porosity [%]	Apparent density [g/cm ³]	Flexural strength [MPa]	Flexural modulus [GPa]
C-C composite	9	1,4	240	80

TABLE 1. Final properties of the composites.

The surface of composites was scanned by SEM Tesla BS 301.

Open porosity and surface roughness were determined by the image analysis method in the system LUCIA 4.21G

(Laboratory Imaging Ltd., Czech republic), using the metal-lurgical microscope Nikon Optiphot 100S and the colour CCD camera Hitachi HV-C20 E/K. The original colour-dig- itised images were taken in polarised light. The green com- ponent of image was extracted to create grey picture highly contrasted and tresholed. Contours of the sample open surface were detected using binary operations of the sys- tem.

Surface roughness was measured by Talysurf model 3 (Rank Taylor Hobson Ltd., England) in PRAGA Hostivar Inc.

X-ray photoelectron spectroscopic analysis (XPS) was undertaken using ESCA 310 Spectrometer to obtain infor- mation on the chemical structure of the composite surface.

Results and discussion

SEM micrographs demonstrate a typical "cauliflower" character of the pyrolytic carbon surface and coarse pores, so-called "pin holes" regularly distributed in fabric bonding point infiltrated by pyrolytic carbon, see FIG. 1.

By image analysis the full surface and smooth surface were automatically measured and compared; typical pore characteristic - the average pore-entrance width was

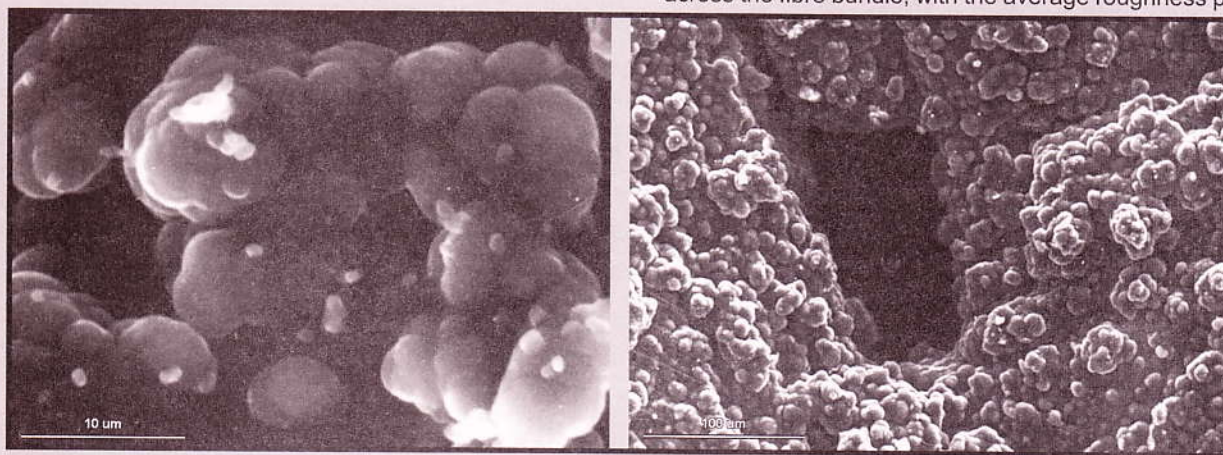


FIG. 1. SEM micrographs of pyrolytic carbon on the sample surface.

counted out.

The average entrance width of coarse pores [IUPAC, $r > 7,5 \text{ mm}$] was measured on the surface sample, with the average value $r = 38,35 \text{ mm}$.

The difference between full and smooth surface - see TABLE 2, demonstrates the roughness of the composite surface. The coarse pores were measured on the sample surface separately.

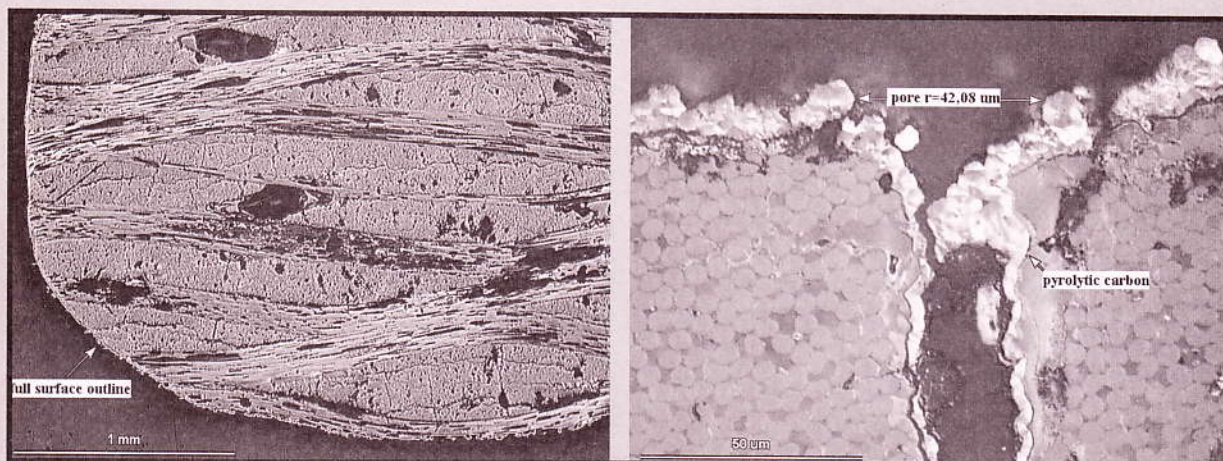


FIG. 2. Optical micrographs for image analysis.

Full surface	16 998,18 μm
Smooth surface	13 651,33 μm
Difference	3 346,85 μm
Pores - surface	203,44 μm
- number of pores	54
- average diameter	3,76 μm
Coarse pores	$r > 7,5 \text{ mm}$
- number of pores	23
- average diameter	38,35 μm

TABLE 2. Surface parameters from Image analy- sis.

Roughness of the samples was too high to be measured on Talysurf across the whole surface sample. FIG.3 dem- onstrates difference in profile along and across the fibre bundle.

Roughness of the surface seems to be too high to en- sure good adhesion of the new layers on the surface. How- ever, it is evident from FIG. 3 that additional appropriate polishing of the composite can lead to destruction of the upper fibre bundle at the fabric bonding points.

Roughness profile from the mean line R_a was measured across the fibre bundle, with the average roughness profile

$R_a = 2,25 \pm 0,3 \text{ mm}$.

The results of X-ray photoelectron spectroscopic analy- sis are shown in TABLE 3.

Contrary to the analysis of carbon fibre surface, where relative content of hydroxyl groups prevails [3], the data in

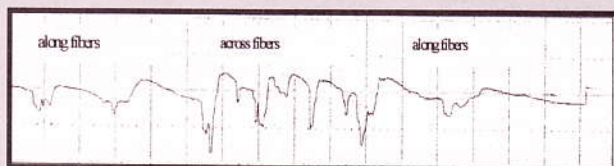


FIG. 3. Plotted profile graph of the sample, magnification 500x/40x.

Table 3 demonstrate a very high content of imine groups on the surface of our samples. This is probably results from the presence of nitrogen in the gas mixture in the tumbling bed reactor.

Element	Binding Energy (eV)	Co-ordination	Population (%)
Nitrogen	399.3	C=NH	76
	400.3	C-NH ₂	24
Oxygen	531.3	C=O	47
	532.4	C-OH	10
	533.5	COOH	36
	535.9	H ₂ O	7

TABLE 3. X-ray photoelectron spectroscopic analysis.

Conclusion

The surface of C-C composites infiltrated and covered with pyrolytic carbon shows a typical "cauliflower" character with large "pin holes" - 150x50 µm and open pores (cracks) with maximum diameter ± 40 µm. Concerning the chemical character, the imine groups prevail on the sample surface.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic under the project No. 106/99/0491.

References

- [1] Sochor, M., Balík, K., Cabrnach, B., Vilímek, M., Křena, J.: Composite plates for osteosynthesis of long bones comparison of experimental and FEM results. *Locomotor System*, vol. 6, No. 2, (1999), 106-113.
- [2] Pešáková, V., Balík, K., Klézl, M., Adam, M.: Biomechanical and biological properties of the implant material carbon-carbon composite covered with pyrolytic carbon. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, (in press).
- [3] Kučera, M., Glogar, P., Balík, K., Tomanová, A.: Heat treatment of carbon fibres and its influence on mechanical properties of C-C composites. *Acta Montana, Ser. B. No. 3 (91)*, (1994), 91-101.

Warunki prenumeraty

Wydawnictwo Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie przyjmuje zamówienia na prenumeratę, która może obejmować dowolny okres, w którym wydawane są kolejne zeszyty. Zamawiający otrzyma zaprenumerowane zeszyty począwszy od daty dokonania wpłaty. Zamówienia wstecz będą realizowane w miarę posiadanych zapasów.

Realizacja zamówienia

Warunkiem realizacji zamówienia jest otrzymanie z banku potwierdzenia dokonania wpłaty przez prenumeratora.

Konto

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
nr rachunku 10501445-1200856001

Należy podać swój adres, tytuł czasopisma, okres prenumeraty i liczbę zamawianych egzemplarzy.

Opłata

roczna - 48,- zł

Subscription terms

Subscription orders should be addressed to the Polish Society for Biomaterials in Kraków.

The ordered issues will be delivered consecutively starting from the date of payment, acknowledged by the bank.

Earlier issues will be supplied if available.

Subscription rates:

12 months - 48,0 zł
6 months - 24,0 zł

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials,
Al. Mickiewicza 30/A-3,
30-059 Kraków, Poland
Bank Śląski S.A. O/Kraków,
account no. 10501445-1200856001

It is requested to quote the subscriber's name, title of the journal, desired subscription period and number of the ordered copies.

I N Ż Y N I E R I A BIOMATERIAŁÓW

Wskazówki dla autorów

Prace do opublikowania w czasopiśmie "Inżynieria Biomateriałów" będą przyjmowane wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski.

Prosimy je nadsyłać na dyskietkach wyłącznie w formacie Word 6.x (lub wyższy) wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

Możliwe jest również dołączanie ilustracji w różnych formatach grafiki typu .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Rozmiar artykułu:

- przeglądowego i pracy oryginalnej - do 10 stron standardowego maszynopisu,
- komunikatu - do 5 stron,
- noty technicznej - do 3 stron

Obowiązuje układ jednostek SI.

Rysunki, tabele i równania powinny być kolejno ponumerowane.

Struktura artykułu:

- streszczenie (do 200 słów),
- słowa kluczowe (3-10 słów),
- wprowadzenie,
- materiał i metodyka,
- wyniki,
- dyskusja,
- wnioski,
- piśmiennictwo (wg systemu Harvard).

Odnośniki literaturowe w tekście należy podawać jako kolejne liczby arabskie w nawiasach kwadratowych.

Piśmiennictwo (zawierające nazwiska autorów i skróty ich imion, tytuł artykułu, tytuł czasopisma, tom, rok w nawiasach okrągłych i strony) powinno być zamieszczone na końcu artykułu. Skróty tytułów czasopism należy unikać bądź podawać zgodnie z Chemical Abstract. Cytując książki należy podawać numery odpowiednich rozdziałów.

Nie przewiduje się wypłacania honorariów autorskich.

Prace należy nadsyłać na adres:

Redakcja "Inżynieria Biomateriałów"
Akademia Górniczo - Hutnicza
Katedra Ceramiki Specjalnej
30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
fax. (48-12) 633-46-30
tel. (48-12) 617-24-62
e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Instructions to authors

Contributions in English language version should be submitted to:

Editorial Office

"Engineering of Biomaterials"

University of Mining and Metallurgy,

Special Ceramics Department,

Al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków, Poland

fax. (48-12) 633-46-30, tel. (48-12) 617-24-62,

e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Texts should be delivered on a 3.5-inch diskette, accompanied by a printout (with a double spacing) including drawings, photographs, tables etc. Recommended is IBM-compatible MS format, e.g. Word 6.x (or higher). Illustrations can be enclosed on diskettes in the formats: .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Advised paper length is:

- review papers and accounts of original unpublished research - up to 10 pages (standard manuscript pages);
- short communications - up to 5 pages;
- technical notes - up to 3 pages.

SI units should be used in the text.

Figures, Tables and Equations should be numbered in corresponding consecutive series of the Arabic numbers.

Layout of the paper should be the following:

- Abstract (up to 200 words)
- Key words (3-10 words)
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References

References should be made in the text by using consecutive Arabic numbers in brackets. Full references (including author's surname and abbreviated names, title of the paper, title of the journal, volume, year in parenthesis and pages) should be given in a list at the end of the paper. Abbreviations of journal titles should be avoided or used in accordance with those listed in Chemical Abstracts. Whenever a book is cited, the number of the relevant chapter should be given.

The journal makes no page charges.

HISTOLOGICZNA OCENA KOMPOZYTU WĘGIEL - ŻYWICA EPOKSYDOWA W OPARCIU O BADANIA DOŚWIADCZALNE NA ZWIERZĘTACH

Grzegorz Bajor*, Daniel Sabat**, Zbigniew Szczurek**

*Katedra Chirurgii Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej w Bytomiu

**Zakład Patomorfologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

Streszczenie

Dla celów realizacji tego eksperymentu użyto królików, którym wszczepiano do światła jamy szpikowej kości udowej grot z kompozytu węgiel - żywica epoksydowa. Kompozyt ten charakteryzuje się bardzo dobrymi właściwościami mechanicznymi, co między innymi ułatwia obróbkę mechaniczną, umożliwia otrzymywanie implantów o złożonych kształtach. Do eksperymentu użyto sześć królików z zastosowaniem kompozytu włókno węglowe, osnowa epoksydowa pokrytych warstwą hydroksyapatytu /implant C-ep-HAP / w okresach obserwacji 4,14,18,20,22 tygodni.

Celem przeprowadzonego badania było określenie przydatności tego materiału jako elementu zespalającego kość, oraz jego biogodności. Wykazano, że w szpiku kostnym otaczającym grot zachodzą procesy resorpcji, a następnie odbudowy kości aż do powstania dojrzałej kości gąbczastej. Tym przemianom towarzyszyła postępująca biodegradacja fragmentów wszczepu, aż do powstania zbrylonych struktur i ich pyłowego rozpadu. Fragmenty tego materiału działają stymulująco na odnowę kości gąbczastej i nie wywoływały odczynu obrzymkomórkowego ani zmian bliznowatych.

W oparciu o przeprowadzone badania potwierdzono walory wytrzymałościowe tego materiału oraz jego biogodność. Natomiast uzyskano jedynie potwierdzenie powolnej biodegradacji rozpoczynającej się na powierzchni tego materiału.

Słowa kluczowe: biomateriały, kompozyty węglowe, żywica epoksydowa, histopatologia, badania na zwierzętach [1,2,12].

[Inżynieria Biomateriałów, 12, (2000), 3-7]

HISTOPATHOLOGICAL EVALUATION OF CARBON-EPOXY RESIN COMPOSITE BASED ON EXPERIMENTS ON ANIMALS

Grzegorz Bajor*, Daniel Sabat**, Zbigniew Szczurek**

*Department of Children Surgery

Silesian Medical Academy in Bytom

**Department of Pathomorphology

Silesian Medical Academy in Zabrze

Abstract

Rabbits with the arrow head-shaped carbon-epoxy resin composite implanted into the femoral bone marrow cavity were used in the experiment. The composite has very good mechanical properties, which enable mechanical working and formation of complex shapes.

Six rabbits with implants made of carbon fibre - epoxy resin composite, coated with hydroxyapatite /C-ep-HAP implant/, were used in 4, 14, 18, 20, 22 weeks of observation.

The aim of the experiment was to determine the usefulness of the composite material as an element uniting bones as well as its biocompatibility. It has been shown that in the bone marrow surrounding the implant there take place the processes of resorption and bone restoration leading to the formation of a mature spongy bone. These changes are accompanied by progressive biodegradation of the implanted fragments, i.e. lumping and dusting.

Fragments of the implanted material stimulate restoration of spongy bone and do not cause gigantocellular reaction or cicatricial changes.

The investigations carried out in this work confirmed good strength and biocompatibility of the implant material. Only slow biodegradation beginning on the surface of the material was observed.

Key words: biomaterials, carbon composites, epoxy resin, histopathology, experiments on animals

[Engineering of Biomaterials, 12, (2000), 3-7]

REGULACJE PRAWNE I ASPEKTY ETYCZNE W BADANIACH DOŚWIADCZALNYCH NA ZWIERZĘTACH

Leszek Solski

Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Akademii Medycznej we Wrocławiu

Słowa kluczowe: zwierzęta doświadczalne, eksperymenty, regulacje prawne, etyka.

[Inżynieria Biomateriałów, 12, (2000), 8-11]

THE LEGAL REGULATIONS AND ETHICAL PROBLEMS CONCERNING THE USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS IN BIOMEDICAL RESEARCH

Leszek Solski

Department of Experimental Surgery and Biomaterials Research

Chair and Clinic of Traumatology and Hand Surgery Medical University, Wrocław

Key words: experimental animals, biological evaluation, legal regulations, ethics.

[Engineering of Biomaterials, 12, (2000), 8-11]

WCZESNY ODCZYN TKANKOWY PO IMPLANTACJI CERAMIKI ISKOPOROWATEJ O MODYFIKOWANEJ POWIERZCHNI. BADANIA DOŚWIADCZALNE

J. Staniszevska-Kuś*, B. Zboromirska-Wnukiewicz**, R. Lewandowski*, L. Solski*,

J. Wnukiewicz*, B. Żywicka*

*Akademia Medyczna we Wrocławiu

** Instytut Elektrotechniki Oddział Technologii i Materiałoznawstwa Elektrotechnicznego we Wrocławiu

Streszczenie

Ocenę biogodności materiałów bioceramicznych przeprowadza się między innymi na podstawie reakcji ogólnoustrojowej i miejscowej, po implantacji w tkanki zwierząt doświadczalnych.

Celem badań jest wykazanie, że struktura fizyczna powierzchni oraz rodzaj technologii otrzymywania biomateriałów może mieć znaczenie dla określenia odczynowości tkankowej.

Badania wykonano na szczurach wszczepiając im domięśniowo trzy rodzaje ceramiki:

ceramikę litą, ceramikę - litą silanowaną, ceramikę porowatą. Sekcje zwierząt

przeprowadzono 7, 30, 90 dni po operacji.

Na podstawie badań patomorfologicznych przeprowadzonych w okresie wczesnym tj. do 3

miesiący po implantacji można stwierdzić, że ceramika silanowana o modyfikowanej powierzchni i określonym, celowo otrzymywanym potencjale elektrokinetycznym zeta,

wywołuje minimalny miejscowy odczyn tkankowy. Nieco bardziej nasilony odczyn tkankowy obserwowano wokół ceramiki litej. Najsilniejszą reakcję tkankową manifestującą się obfitą i długotrwałą fazą wysiękową stwierdzono wokół ceramiki porowatej.

Słowa kluczowe: biomateriały ceramiczne: lite, lite silanowane, porowate, odczyn tkankowy, badania doświadczalne.

[Inżynieria Biomateriałów, 12, (2000), 12-16]

EARLY TISSUE REACTION AFTER IMPLANTATION OF SURFACE-MODIFIED CERAMICS. EXPERIMENTAL STUDY

J. Staniszevska-Kuś*, B. Zboromirska-Wnukiewicz**, R. Lewandowski*, L. Solski*, J.

Wnukiewicz*, B. Żywicka*

*Medical Academy in Wrocław

****Electrotechnical Institute, Technological Unit and Electrotechnical Department of Wrocław Technical University**

Abstract

One of the methods of evaluating the biocompatibility of ceramic materials is based on analysing local and general reactions of the organism after implantation into the tissues of experimental animals.

The main target of this study was to demonstrate that physical structure of the surface and technology of biomaterials may influence the tissue reactions.

The study made on rats, to the muscles of which three types of ceramics were implanted: solid ceramics, silanoated solid ceramics and porous ceramics.

Animals were sacrificed after 7, 30, 90 days from the implantation.

On the basis of pathomorphological studies in the early period (3 months after implantation) we stated that solid ceramics, with the modified surface and certain electrokinetic potential zeta, evoked minimal local tissue reaction. A slightly more intensive tissue reaction was observed around the non-modified solid ceramics. The most intensive tissue reaction manifested by an abundant and long-lasting exudative phase was observed around the porous ceramics.

Key words: Ceramic biomaterials: solid, solid silanoated, porous, tissue reaction, experimental study

[Engineering of Biomaterials, 12, (2000), 12-16]

WŁÓKNA Z REGENEROWANEJ CHITYNY. BADANIA BIOLOGICZNE

*Danuta Paluch, *Stanisław Pielka, **Lidia Szosland, *Jolanta Staniszevska-Kuś,

*Maria Szymonowicz, *Leszek Solski, *Bogusława Żywicka

*Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Katedry Chirurgii Urazowej i Chirurgii Ręki Akademii Medycznej we Wrocławiu

** Katedra Chemii Fizycznej Polimerów Politechniki Łódzkiej

Streszczenie

Celem pracy była ocena biozgodności włókien z chityny. Badania obejmowały: badania biologiczne wyciągów wodnych, badania działania cytotoksycznego, badania działania hemolitycznego, badanie śródskórnego działania drażniącego oraz badania implantacyjne.

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono działania hemolitycznego, cytotoksycznego i śródskórnego działania drażniącego. Proces wgajania przebiegał z krótkotrwałą fazą wysiękową o małym stopniu nasilenia, która około 14 dnia przechodziła w fazę proliferacyjną prowadzącą do wytworzenia torebki łącznotkankowej.

Słowa kluczowe: regenerowana chityna, cytotoksyczność, działanie drażniące, miejscowa reakcja tkankowa.

[Inżynieria Biomateriałów, 12, (2000), 17-22]

BIOLOGICAL INVESTIGATION OF THE REGENERATED CHITIN FIBRES

*Danuta Paluch, *Stanisław Pielka, **Lidia Szosland, *Jolanta Staniszevska-Kuś,

*Maria Szymonowicz, *Leszek Solski, *Bogusława Żywicka

*Department of Experimental Surgery and Biomaterials Research

Chair of Traumatology, Medical University, Wrocław

**Department of Physical Chemistry of Polymers Technical University of Łódź

Abstract

The main purpose of this investigation was the biological evaluation of the regenerated chitin fibres and their usability in medicine. Our investigation included laboratory tests of the aqueous extracts, haemolytic effects of the aqueous extracts, the cytotoxicity tests, intracutaneous reactivity test and the local reaction after implantation.

In the conclusion we say that the fibres of regenerated chitin do not cause the haemolysis, cytotoxicity or intracutaneous irritation. The healing process of both types of fibres involved a short exudative phase, which after 14 days was followed by a proliferative phase. The latter ended with the development of a connective tissue capsule.

Key words: regenerated chitin, cytotoxicity, haemolytic effect, local tissue reaction.

[Engineering of Biomaterials, 12, (2000), 17-22]

MATERIAŁY KOMPOZYTOWE Z NOWEGO BIODEGRADOWALNEGO KOPOLIMERU GLIKOLID-LAKTYD DLA CELÓW MEDYCZNYCH

Elżbieta Pamuła*, Jan Chłopek*, Marta Błażewicz*, Katri Makinen**, Piotr Dobrzyński***, Janusz Kasperczyk***, Maciej Bero***

* Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Kraków

** Tampere University of Technology, Faculty of Materials Engineering, Tampere, Finlandia

*** Centrum Chemii Polimerów, Polska Akademia Nauk, Zabrze

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań nad otrzymaniem śrub i kształtek wykonanych z biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktyd, zsyntetyzowanego z użyciem niskotoksycznego związku cyrkonu, oraz z kompozytów wykonanych z tego kopolimeru wzmocnionego włóknami węglowymi. Oceniono właściwości mechaniczne i mikrostrukturalne otrzymanych materiałów a także ich zachowanie się w symulowanym środowisku biologicznym. Badania wykazały, że opracowane materiały ulegają degradacji w przeciągu kilku tygodni inkubacji w środowisku wodnym. Wprowadzenie włókien węglowych powoduje polepszenie właściwości wytrzymałościowych wyrobów i zmienia czas procesu biodegradacji.

[Inżynieria Biomateriałów, 12, (2000), 23-30]

COMPOSITE MATERIALS FROM A NEW BIODEGRADABLE GLYCOLIDE-LACTIDE CO-POLYMER FOR MEDICAL APPLICATIONS

Elżbieta Pamuła*, Jan Chłopek*, Marta Błażewicz*, Katri Makinen**, Piotr Dobrzyński***, Janusz Kasperczyk***, Maciej Bero***

* University of Mining and Metallurgy, Faculty of Materials Science and Ceramics in Cracow

** Tampere University of Technology, Faculty of Materials Engineering, Tampere, Finlandia

*** Centre of Polymers Chemistry, Polish Academy of Science, Zabrze

Abstract

The paper presents the results of studies on the manufacturing of screws and other shaped elements from a biodegradable glycolide-lactide co-polymer obtained with the aid of a non-toxic compound of zirconium and from the composites consisting of the co-polymer matrix and carbon fibre reinforcement. Evaluated were the mechanical and microstructural properties of the obtained materials as well as their behaviour in a simulated biological medium. It has been stated that the investigated materials undergo degradation during several weeks of incubation in an aqueous environment. The addition of carbon fibres improves the strength of devices and affects the biodegradation time.

[Engineering of Biomaterials, 12, (2000), 23-30]