

Odczyn tkankowy po implantacji biomateriałów ceramicznych z wprowadzonym na powierzchnię potencjałem elektrokinetycznym zeta

Robert Lewandowski*, Roman Rutowski**, Jolanta Staniszevska-Kuś,*
Stanisław Pielka,* Beata Wnukiewicz.***

* Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów
Akademii Medycznej we Wrocławiu

** Katedra Chirurgii Urazowej i Klinika Chirurgii Ręki
Akademii Medycznej we Wrocławiu

***Instytut Elektrotechniki Oddział Technologii
i Materiałoznawstwa Elektrotechnicznego we Wrocławiu

Streszczenie

Badania nad implantami wykazały, że nie tylko rodzaj struktury materiału, ale również charakter powierzchni wpływa na odczyn miejscowy. Dążenie do uzyskania jak najlepszych właściwości biologicznych implantów, przeznaczonych do uzupełniania ubytków kostnych, przyczyniło się do przeprowadzenia badań nad implantami o powierzchni aktywnej. Reakcje elektrochemiczne, zachodzące na powierzchni implantów, prowadzą do powstania zjawisk elektrycznych na granicy faz implant-tkanka i powstania tzw. potencjału zeta. Wykorzystanie tych właściwości w implantologii, skłoniło nas do przeprowadzenia badań eksperymentalnych, z zastosowaniem biomateriałów o zmodyfikowanej powierzchni i wpływie potencjału zeta na biogodność.

Przeprowadzone badania dotyczyły porównawczych badań odczynu tkankowego implantów ceramicznych o powierzchni litej i porowatej, oraz wpływu ładunku elektrycznego zeta na odczyn tkankowy. Do badań wykorzystano 3 rodzaje ceramiki: porowatą, litą i ceramikę litą z potencjałem zeta (silanowaną). Badania przeprowadzono na 50 szczurach, którym wszczepiono ceramikę w mięśnie grzbietu. Badania patomorfologiczne przeprowadzono po 1, 4, 12, 26 i 32 tygodniach po implantacji.

Wyniki badań patomorfologicznych po implantacji ceramiki litej i litej silanowanej wykazały, że już po tygodniu wytwarzała się cienka błonka z widocznymi, drobnymi naczyniami krwionośnymi. Po 32 tygodniach była ona nieznacznie grubsza. Wytworzona torebka była silnie zrośnięta z otaczającymi mięśniami, a od strony implantu przylegała do jego powierzchni. W przypadku implantów ceramiki porowatej, już po tygodniu wytworzona torebka łącznotkankowa była wyraźnie grubsza, a po 32 tygodniach była biaława,

nieprzezroczysta, silnie zrośnięta z otaczającymi mięśniami i wrastała w pory ceramiki.

W badaniach mikroskopowych wykazano, że zarówno w okresie wczesnym jak i odległym, charakter i wielkość odczynu tkankowego były zależne od struktury powierzchni implantu. Ceramika porowata implantowana w tkanki miękkie, wywoływała silniejszy odczyn zapalny, charakteryzujący się długo trwającą fazą wysiękową, która prowadziła do wytworzenia się grubej torebki łącznotkankowej. 32 tygodnie po implantacji, w wytworzonej torebce widoczne były ogniska tkanki chrzęstnej. Odczyn tkankowy występujący wokół ceramiki litej, charakteryzował się krótszą i mniej nasiloną fazą wysiękową. Po 32 tygodniach widoczna była cienka torebka łącznotkankowa.

Ceramika z potencjałem zeta (silanowana) wywoływała minimalny odczyn tkankowy, bez widocznej fazy wysiękowej. W badaniach w mikroskopie świetlnym i skaningowym, wykonanych 32 tygodnie po implantacji stwierdzono obecność cienkiego pasma tkanki łącznej z ogniskami szkliwienia i wapnienia, a na powierzchni ceramiki tworzyły się blaszki kostne.

Tissue reaction after implantation of ceramic biomaterials with introduced electrokinetical zeta potential on surface

Summary

Studies over implants showed, that not only the kind of structure of material, but also the character of surface influences the local reaction. Endeavour to obtain the best possible biological proprieties of implants, intended to supplementing of osseous decreases, contributed to carrying out investigations over implants about active surface. Electrochemical reactions, occurring on implants surface, lead to beginning of electric occurrences on implant/tissue interface and beginning of so-called potential zeta. Utilization of these proprieties in implantology, induced us to carry out experimental studies with use of biomaterials with modified surface and of influence of potential zeta on biocompatibility.

The carried out studies referred: to comparative investigations of tissue reaction of implants ceramic with of solid and porous surface, and to influence of electric load zeta on tissue reaction. For the studies were used 3 kinds of ceramics: porous, solid and solid ceramics with potential zeta (silanovated). The studies were carried out on 50 rats, to which studied ceramics was implanted into back muscles. Patomorphological assessments were carried out 1, 4, 12, 26 and 32 weeks after implantation.

The results of patomorphological studies after implantation of ceramics solid and solid silanovated showed, that already after 1 week was formed thin

membrane with visible, small blood - vessels. After 32 weeks it was significantly thicker. The produced capsule was strongly connected with surrounding muscles, and from side the implant adhered to it's surface . In case of implants of porous ceramics, already after 1week the produced capsule of connective tissue was clearly thicker, and after 32 weeks it was, whitish, opaque, strongly connected to surrounding muscles. From side implant it became rooted in pores of ceramics.

In microscopic studies it was shown, that both in early and distant period, the character and size of tissue reaction was dependent on structures of implant surface. Porous ceramics implanted in soft tissues, produced stronger inflammatory reaction being characterized with long lasting phase infiltration, which drove to producing thick connective tissue capsule. 32 weeks after implantation in the produced capsule these were visible former focuses of chondroid tissue. Reaction tissue occurring round solid ceramics, was characterized with shorter and less intensive proliferation phase. After 32 weeks visible former thin connective tissue capsule was visible.

Ceramics with potential zeta (silanovated) generated minimum - tissue reaction, without visible proliferation phase. Studies in light and scanning microscopes, executed 32 weeks after implantation showed, that in produced thin layer of connective tissue were visible with adamantinizing and calcifications focuses, and on the surface of ceramics were formed osseous tin plates.

Słowa kluczowe: odczyn tkankowy, ceramika, potencjał elektrokinetyczny zeta

Key words: tissue reaction, ceramic, electrokinetical zeta potential

Wstęp

Według danych statystycznych w ciągu roku u ludzi dokonuje się około 5 milionów wszczepów materiałów niebiologicznych, głównie metali i ich stopów (żelazo, chrom, nikiel, molibden, tytan, tantal, niob, stop Co-Cr-Mo), minerałów (węgiel, krzem, tlenek glinu) lub polimerów syntetycznych (silikony, politetrafluoroetylen, polikwas glikolowy) [1]. Wszczepy te nazywamy biomateriałami i są one stosowane jako implanty trwałe lub czasowe. Dotychczas nie wytworzono żadnego materiału o pełnej zgodności biologicznej [2,3]. Wysokie wymagania stawiane biomateriałom, stwarzają potrzebę pogłębiania wiedzy o ich właściwościach chemicznych, fizykomechanicznych oraz biologicznych. Pełna ocena danego materiału może okazać się możliwa, dopiero po kilku, kilkunastu,

a nawet kilkudziesięciu latach obserwacji klinicznej. Wynika stąd konieczność ciągłego rozwijania i pogłębiania badań laboratoryjnych, przedklinicznych oraz wstępnych badań klinicznych, między innymi w celu przewidzenia odległych skutków wprowadzenia biomateriałów do ludzkiego organizmu [1,4].

Podczas wytwarzania współczesnych, bioceramicznych kompozytów, często występuje potrzeba wprowadzania specyficznych spoiw i stosowania nietypowych metod technologicznych, które pozwalają na dokładne ich formowanie, zapewniają odpowiednie właściwości fizykochemiczne, a w końcowym efekcie, pozwalają uzyskać optymalnie zaprogramowane właściwości [3,5,6].

Wytwarzanie materiału zastępczego o takich parametrach jak kość jest bardzo trudne [7]. W większości publikacji kość traktowana jest, jako materiał konstrukcyjny, różnicowany anatomicznie. W zależności od funkcji w organizmie, główny nacisk kładzie się na budowę teksturalną tj. wielkość i kształt porów [8,9]. Biomateriały przeznaczone dla chirurgii mają zbliżone właściwości mikrostrukturalne i chemiczne. Od niedawna zainteresowanie badaczy wzbudzają zjawiska, zachodzące na granicy faz, między ciałem stałym (tkanka, implant) a otaczającym je środowiskiem [5,7,10]. Zjawiska te mają charakter elektrokinetyczny i zachodzą na powierzchni implantów; przypuszcza się, że ma to korzystny wpływ na biogodność wprowadzonych do ustroju ludzkiego biomateriałów [11,12,13,14].

Wśród materiałów bioceramicznych wiele badań poświęcono tlenkowi glinu, zarówno w formie zwartej, jak i porowatej. Zwarty tlenek glinu znalazł zastosowanie przy wytwarzaniu endoprotez stawów. Brak reakcji tkanki żywej na implanty z tlenku glinu, dotyczy jedynie α - Al_2O_3 (korundu). Inne formy Al_2O_3 łatwo reagują chemicznie i nie są przydatne do celów chirurgicznych [15,16].

Zwarty, nieporowaty korund, implantowany w tkanki miękkie, pokrywa się bardzo cienką warstwą tkanki włóknistej, czym wyraźnie różni się od metali i polimerów organicznych. Duże zainteresowanie u ortopedów wzbudziła ceramika porowata, ponieważ moduł Younga zbliżony jest do kości zbitiej, co zapewnia ich wzajemne mechaniczne współdziałanie, poprzez wiązanie biologiczne z kością, jeżeli wrośnie ona w pory materiału. Pory wywołują jednak poważne osłabienie mechaniczne, co ogranicza zastosowanie ceramiki porowatej. Włókna unaczynionej tkanki łącznej w ciągu 3-6 miesięcy wrastały w pory ceramiki. W dużych porach przypowierzchniowych występowały włókna mięśni. Opisana reakcja tkankowa występuje wokół tworzyw ceramicznych: $\text{CaO} - \text{Al}_2\text{O}_3$, $\text{CaO} - \text{TiO}_2$, $\text{CaO} - \text{ZrO}_2$, TiO_2 , Al_2O_3 .

Wrastanie tkanki do porów implantu jest uzależnione od ich rozmiarów. Struktura powierzchni implantów jest niezwykle ważnym parametrem. Wenneberg i współpracownicy przeprowadzili badania z zastosowaniem implantów dentystycznych, w zależności od szorstkości powierzchni

(1-1.5 μm). Wpływ szorstkości powierzchni na szybką odpowiedź kostną badali, używając aparatury laserowej i mikroskopu skaningowego. Pomiar szorstkości powierzchni przy pomocy trójwymiarowego skanera laserowego, ma rozstrzygnąć o najbardziej optymalnej szorstkości powierzchni implantów dentystycznych, na najbardziej pożądaną odpowiedź tkanki kostnej.

B. Boyan wraz ze współpracownikami zauważył, że przy powierzchni każdego rodzaju implantu, tworzy się żel zawierający białka, tłuszcze, węglowodany i wodę, poprzez który zachodzi przepływ jonów do i od implantu. Woda występuje w formie związanej, w postaci kompleksu lub jako wolna woda. Ma to wpływ na przeobrażenie faz fosforanowych przy powierzchni implantu, poziom pH i ładunek elektryczny absorbowanych cząstek organicznych [17]. Autorzy tych badań postawili wiele pytań:

- a/ Czy fibroblasty mają rolę stymulującą czy inhibitującą przy powierzchniach aktywnych implantów ?
- b/ Jaka jest siła wiązania kolagenu z powierzchnią aktywną ?
- c/ Jak wpływa obecność implantu na kinetykę przebudowy sąsiadującej kości?
- d/ Jaka jest rola krzemu przy mineralizacji powierzchni kontaktu tkanka-implant?
- e/ Jaka jest rola protein niekolagenowych na powierzchni implantu ?

W ostatnich latach zainteresowanie badaczy wzbudzają reakcje elektrochemiczne na powierzchni implantów co prowadzi do powstawania zjawisk elektrycznych na granicach fazowych i powstawania tzw. potencjału zeta. W celu zaprezentowania potencjału zeta niezbędny jest opis zjawisk elektrycznych na granicy faz. Teoria i praktyka wskazują, że oddziaływania elektryczne mają istotne znaczenie w procesach zachodzących w układach mineralogicznych.

Oddziaływania pomiędzy dwoma obiektami, w tym między ziarnem i pęcherzykiem, bez względu na to, czy stykają się ze sobą, czy też znajdują się w pewnej odległości od siebie, można opisywać jako sumę różnych oddziaływań, w tym oddziaływań elektrycznych. Wprowadzenie do wody jakiegokolwiek substancji ciekłej, stałej czy gazowej tworzącej odrębną fazę, powoduje zmiany na granicy tych faz. Określenie to bierze się stąd, że na powierzchni ciała znajdującego się w wodzie pojawia się warstwa ładunku elektrycznego, która jest neutralizowana w drugiej warstwie, znajdującej się przy powierzchni za warstwą pierwszą, ale w roztworze wodnym z reguły dochodzi do wytworzenia elektrycznej warstwy podwójnej. Określenie „elektryczna warstwa podwójna” zapisuje się często skrótem ewp.

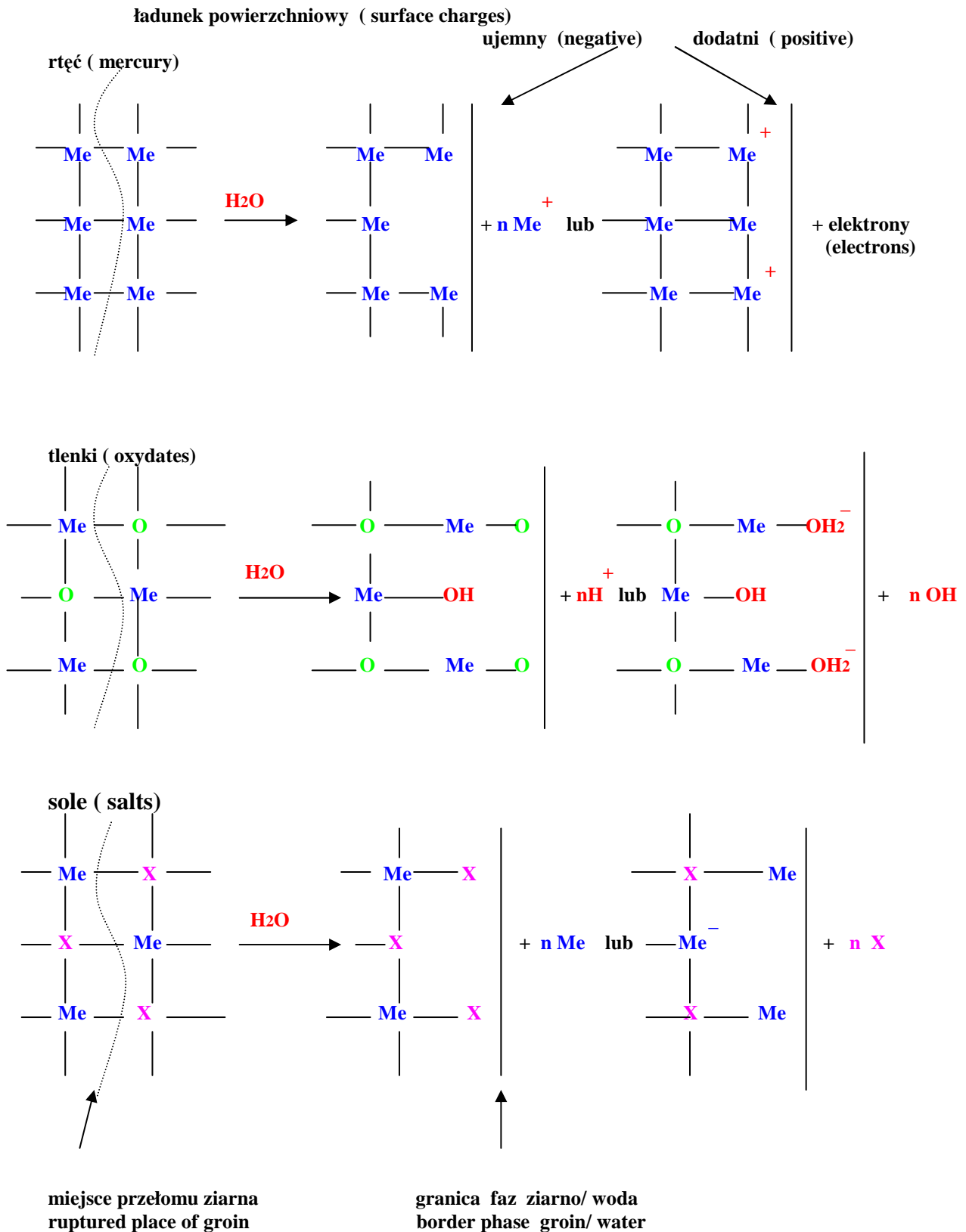
Budowa elektryczna warstwy podwójnej ciał w wodzie, zależy od mechanizmu formowania się ewp. W przypadku metali, których powierzchnia nie reaguje z wodą, ich ewp tworzy się dzięki gromadzeniu elektronów przy granicy fazowej od strony metalu. Gromadzenie się elektronów wynika albo z przechodzenia pewnej ilości metalu do roztworu w formie kationów, albo z

przyłożenia do metalu zewnętrznego potencjału. Wtedy powierzchnia metalu przyjmuje ładunek ujemny. Ładunek dodatni na powierzchni metalu powstaje wtedy, gdy elektrony są wyprowadzone z metalu. Zapis formowania się ładunku elektrycznego w ewp na powierzchni metali przedstawiono na schemacie 1.

Nieco inaczej formuje się elektryczna warstwa podwójna na ciałach, które nie przewodzą prądu elektrycznego. Przyczyną pojawienia się ładunku elektrycznego na powierzchni soli, jest przechodzenie do roztworów jonów.

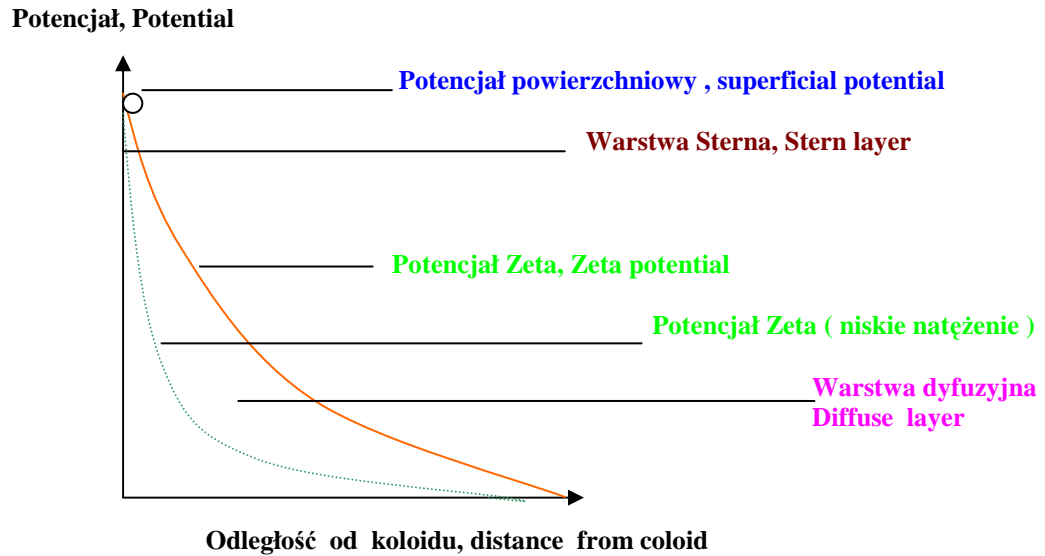
Na przykład dla NaCl będą to jony Na i Cl^- . Im więcej jonów przejdzie do roztworu, tym ładunek powierzchniowy będzie większy. Jeżeli do układu o uformowanej elektrycznej warstwie podwójnej wprowadzi się dodatkowo jony, które wchodzi również w skład substancji, czyli potencjałotwórcze, to ładunek elektryczny w elektrycznej warstwie podwójnej będzie rósł w miarę wzrostu ich stężenia [18].

Podwójna warstwa tworzy się w celu zneutralizowania naładowanego koloidu co prowadzi do powstania potencjału elektrokinetycznego, pomiędzy powierzchnią koloidu i jakimkolwiek punktem masy zawieszonym w płynie. Różnica napięć jest rzędu miliwoltów i odnosi się do potencjału powierzchni. Wielkość powierzchni potencjału, jest związana z ładunkiem na powierzchni i grubością podwójnej warstwy. Po opuszczeniu powierzchni, potencjalne krople odgraniczają się w warstwie Sterna i wtedy wykładniczo przez rozproszoną warstwę zbliżają się do zera, przy urojonej granicy podwójnej warstwy (schemat 2).



Schemat 1. Formowanie się ładunku powierzchniowego na metalach, tlenkach i solach

Scheme 1. Formating surface charges on metals, oxydates and salts



Schemat 2. Zależność pomiędzy potencjałem zeta i potencjałem powierzchni, uzależnionym od poziomu jonów w roztworze. Krzywa potencjału wskazuje na siłę elektrycznego oddziaływania pomiędzy cząsteczkami, a odległością

Scheme 2. Dependence between zeta potential and surface potential in dependences from quantity ions in solution. Potential curve indicates electric influence between parts

Naładowane cząstki mogą poruszać się z ustaloną szybkością w polu elektrycznym. To zjawisko nazywane jest elektroforezą. Ruchliwość naładowanych cząsteczek zależy od stałej dielektrycznej, lepkości płynu i od potencjału elektrycznego powstałego na granicy między poruszającą się cząstką i płynem. Ta granica nazywana jest płaszczyzną poślizgu i zwykle definiowana jest jako punkt, gdzie warstwa Sterna i warstwa rozproszona spotykają się. Warstwa Sterna ściśle przytwierdza się do koloidu, podczas gdy rozproszona nie. W wyniku tego połączenia potencjał elektryczny jest związany z poruszającą się cząstką i nazywa się potencjałem zeta [18].

Chociaż potencjał zeta jest wartością pośrednią, to w pewnych okolicznościach oznaczanie jego wartości jest bardziej przydatne, niż potencjału powierzchni. Potencjał zeta może być określony ilościowo w mikroskopie elektronowym poprzez obserwację wędrujących cząstek koloidalnych w naładowanym polu.

Potencjał elektrokinetyczny można wyznaczyć na podstawie pomiaru ruchliwości elektroforetycznej lub elektroosmotycznej w polu elektrycznym. Wartość tego potencjału określa się na podstawie wzoru:

$$\zeta = \frac{u \cdot 4 \pi \eta}{D}$$

gdzie: u- ruchliwość ziaren w polu elektrycznym, η - lepkość ośrodka ciekłego,
D- stała dielektryczna ośrodka [18]

Obecnie można już zaplanować wytwarzanie bioceramicznych kompozytów pozwalających na określenie ich struktury i tekstury, a także modyfikacji powierzchni tak, żeby w końcowym efekcie uzyskać optymalne, zaprogramowane właściwości, w tym potencjał elektrokinetyczny zeta [19].

Najbardziej miarodajnym określeniem biogodności materiałów ceramicznych, jest obraz histologiczny na granicy implant-tkanka. We wczesnym okresie pojawiają się komórki zapalne typu limfocyta i komórki mezenchymalne, ale równocześnie obserwuje się występowanie fibrocytów, fibroblastów oraz osteoblastów i osteocytów, które następnie przekształcają się w tkankę kostną, przylegającą do ściany wszczepu. Takie implanty nazywa się osteoindukcyjnymi [20].

ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Badania reakcji tkanek miękkich, przeprowadzono po implantacji ceramiki porowatej, litej i litej z potencjałem zeta (silanowanej) do mięśni poprzecznie prążkowanych u szczurów. Ceramika lita silanowana - jako jedyna - cechowała się aktywnością powierzchni. Celem pracy były badania porównawcze odczynu tkankowego implantów ceramicznych, o powierzchni litej i porowatej, oraz ocena wpływu ładunku elektrycznego z potencjałem zeta na odczyn tkankowy.

CHARAKTERYSTYKA I OTRZYMYWANIE MATERIAŁU

Ceramikę litą, litą silanowaną i porowatą wykonano w Instytucie Elektrotechniki Oddział Technologii i Materiałoznawstwa Elektrotechnicznego we Wrocławiu.

Ceramikę litą i litą silanowaną w kształcie walców o wymiarach dł. 10 mm i śr. 3 mm o składzie chemicznym CaO-2%, MgO-3%, Al₂O₃-95%, wypalano w temp. 1500° C przez 6 godzin. Obie ceramiki otrzymano metodą zol-żel. Ceramikę litą o aktywnej powierzchni otrzymywano w procesie silanowania. Powierzchnia implantów modyfikowana była N-b-aminoetylo-g-amino-propylotrimetoksylanem {H₂N (CH₂)₂ NH(CH₂)₃ (OCH₃)₃}, produkowanym pod nazwą Z6020, w sposób opisany poniżej. Wypalone w temp. 1500° C przez 0,5 godz. implanty ceramiczne poddawano

procesowi silanowania, zwilżając je 0,12% (objętościowo) roztworem silanu w izopropanolu. Implanty pozostawiano na 72 godz. w temp. otoczenia. Roztwór dekantowano. Implanty suszono w temp. 60° C przez 3 godz. Następnie wielokrotnie płukano je aż do uzyskania roztworu o pH ok. 6-7.

Powierzchnie ceramiki litej i litej silanowanej, oglądane w mikroskopie skaningowym przy powiększeniu 2000 x, zbudowane są z licznych ziaren o nieregularnym kształcie i różnej wielkości. Ziarna te ułożone są miejscami ściśle, a miejscami luźno względem siebie. Mniejsze ziarna wykazują bardziej owalny i regularny kształt, natomiast ziarna średniej wielkości oraz duże są bardziej nieregularne, a ich brzegi są ostre. Niektóre ziarna są zlepione tworząc różnej wielkości konglomeraty.

Ceramika porowata. Odważone ilości tlenku glinu, tlenku magnezu, węgla wapnia dokładnie wymieszano, następnie do tej mieszaniny wprowadzono odmierzoną ilość roztworu wodnego politlenochlorku glinu (o charakterze kwaśnym) i dokładnie mieszano. Wydzielający się dwutlenek węgla z rozkładu węgla wapnia powodował spienienie masy. Odlewano z niej kształtki do badań biologicznych. Po wyjęciu kształtek z formy i po wysuszeniu (48 godz. na powietrzu i 24 godz. w suszarce w temp. 110° C), wypalano je wstępnie w temp. 1200° C. Następnie wypalano je końcowo w temp. 1550° C w piecu elektrycznym. W końcowym etapie wypalane kształtki poddawano trawieniu w 85% kwasie ortofosforowym w temp. ok. 200° C przez 10-15 minut, po czym dokładnie płukano w wodzie bieżącej, a następnie w destylowanej, aż do zaniku reakcji na jony PO_4 .

METODY BADAŃ

Badania na zwierzętach zostały wykonane w Zakładzie Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów za zgodą Komisji Etycznej Nr KEBN 103/99 z dnia 10.03.1999 r. Badanie miejscowych odczynów tkanek miękkich po implantacji przeprowadzono na 50 białych szczurach, hodowli wsobnej, szczepu Wistar, samicach w wieku około 4-6 miesięcy i wadze ok. 150-200 g.

Skórę i tkankę podskórną przecinano w linii środkowej grzbietu. Po prawej i lewej stronie kręgosłupa wykonywano w mięśniach kieszonki, do których wkładano po 2 próbki odpowiedniej ceramiki.

Grupa I - ceramika lita.

Grupa II - ceramika lita silanowana.

Grupa III - ceramika porowata.

Mięśnie i ranę skóry zaszywano pojedynczymi szwami. Sekcje szczurów wykonano po 1, 4, 12, 26, 32 tygodniach, przeznaczając na każdy termin po 5 zwierząt. W czasie sekcji pobierano wycinki tkanek miękkich wraz z implantem, do badań patomorfologicznych i w mikroskopie skaningowym.

WYNIKI BADAŃ

Badania makroskopowe

W grupie I- ceramika lita i w grupie II- ceramika lita silanowana, wyniki badań były identyczne, dlatego opis wyników podano wspólnie.

Tydzień po implantacji, na powięzi obserwowano drobne punktowe wybroczyny krwawe. W bezpośrednim sąsiedztwie implantów widoczne były mięśnie grzbietu o prawidłowym rysunku. Powierzchnia implantów pokryta była cienką, przezroczystą błoną, w której widoczne były drobne cienkościenne naczynia krwionośne. Wytworzona torebka nie była związana z powierzchnią implantów. Po nacięciu torebki z łatwością można było usunąć wszczepy (ryc. 1).

4 tygodnie po operacji, po odpreparowaniu skóry mięśnie grzbietu nie wykazywały zmian o charakterze patologicznym. Kolor i wygląd mięśni był prawidłowy. Implanty przeświecały przez powierzchniową warstwę mięśni. Po nacięciu mięśni stwierdzono, że implant pokryty był bardzo cienką, przezroczystą błoną, która silnie związana była z mięśniami. Po nacięciu torebki wszczepy było można łatwo usunąć.

12, 26 i 32 tygodnie po operacji, u niektórych szczurów implanty przeświecały przez powierzchniową warstwę mięśni, a u innych były prawie niewidoczne.

W bezpośrednim sąsiedztwie implantów otaczające mięśnie były prawidłowe. Po odpreparowaniu mięśni stwierdzono, że implanty pokryte są nieco grubsza, białawą torebką, w której widoczne były naczynia krwionośne. Wytworzona torebka ściśle przylegała do mięśni. Po nacięciu torebki implant usuwano z lekkim oporem (ryc. 2).

W grupie III w pierwszym tygodniu po implantacji na powierzchni mięśni widoczne były drobne, punktowe, krwawe wybroczyny. Implanty leżały w mięśniach pokryte cienką, przezroczystą błoną, przez którą przeświecała ich porowata struktura. Pory ceramiki były wypełnione czerwono-brunatnymi masami. Wytworzona tkanka wrastała w pory ceramiki i z trudnością można było ją oddzielić od powierzchni wszczepu.

4 tygodnie po operacji implanty leżały wśród mięśni i były pokryte białawą błoną, przez którą przeświecała porowata powierzchnia ceramiki. Wytworzona tkanka silnie wrastała w pory wszczepów. Na powierzchni torebki widoczne były cienkościenne naczynia krwionośne. Powstała torebka silnie przylegała do warstwy mięśni.

12 tygodni po implantacji torebka wytworzona na powierzchni ceramiki porowatej była nierównej grubości. Na jej powierzchni widoczne były naczynia krwionośne. Pory implantu wypełniała czerwona tkanka. Wytworzona torebka silnie była zrośnięta z powierzchnią ceramiki i zrywała się podczas usuwania implantu. Opisywana torebka była również silnie zrośnięta z przylegającymi mięśniami (ryc. 3).

Po 26 i 32 tygodniach po implantacji obraz makroskopowy był identyczny. Wszczepy pokrywała gruba, biaława, matowa torebka, przez którą nie widać było porowatej struktury powierzchni implantu. Wytworzona torebka była silnie zrośnięta, zarówno od strony mięśni jak i od strony implantu. Usuwanie wszczepu z torebki sprawiało znaczną trudność, co wskazywało na silne wrastanie wytworzonej tkanki w pory ceramiki.

Badania mikroskopowe

Grupa I – Ceramika lita

Tydzień po implantacji, w preparatach histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną (HE) oraz wykonanych z mięśni grzbietu szczura z miejsca bezpośredniego kontaktu z implantem, stwierdzono puste przestrzenie ograniczone bogatokomórkową tkanką łączną. Wytworzone pasmo łącznotkankowe było miejscami węższe, a miejscami szersze, wynosiło 3-10 szerokości włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego i było nieostro odgraniczone od mięśni. Opisywane pasmo łącznotkankowe było zbudowane przede wszystkim z licznych fibroblastów, mniej licznych fibrocytów, pojedynczych komórek plazmatycznych i makrofagów. Miejscami widoczne były pączkujące naczynia krwionośne. Od strony implantu wytworzona torebka łącznotkankowa miała gładką powierzchnię i pokryta była komórkami o spłaszczonych jądrach. W preparatach barwionych metodą van Gieson uwidoczniono pojedyncze, czerwono barwiące się włókna klejrodne.

4 tygodnie po implantacji widoczne były przestrzenie po implantach ograniczone dość cienkim, gładkim, włóknistym pasmem łącznotkankowym, ostro odgraniczonym od mięśni. Pasma te nie przekraczały 1-3 przekroju włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego. Zbudowane było przede

wszystkim z fibrocytów. W preparatach barwionych metodą van Gieson uwidoczniono liczne czerwono barwiące się włókna klejorodne.

12, 26 i 32 tygodnie po implantacji obraz mikroskopowy był identyczny. W preparatach barwionych HE, widoczne były przestrzenie po implantach, ograniczone cienkim, włóknistym, zbitym pasmem tkanki łącznej. Szerokość opisywanego pasma nie przekraczała szerokości włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego (ryc. 4). W preparatach barwionych metodą van Gieson opisywane pasmo barwiło się na czerwono.

Grupa II – Ceramika lita z potencjałem zeta (silanowana)

Tydzień po implantacji w preparatach histologicznych barwionych HE, wykonanych z mięśni grzbietu szczura z miejsca bezpośredniego kontaktu z implantem, widoczne były owalne przestrzenie. Opisywana przestrzeń otoczona była cienkim pasmem bogatokomórkowej tkanki łącznej. Szerokość tego pasma wynosiła do 3 przekrojów średnicy włókna mięśnia poprzecznie prążkowanego. W wytworzonym paśmie łącznotkankowym widoczne były jednojądrzaste komórki typu limfocyta, fibroblasta oraz pojedyncze fibrocyty. Gdziekolwiek widoczne były pojedyncze ogniska homogenie barwiących się mas włókniaka. Opisywane komórki wnikały pomiędzy poszczególne włókna mięśniowe.

4 tygodnie po implantacji w preparatach histologicznych stwierdzono podłużne lub okrągłe przestrzenie. Kształt tych przestrzeni zależał od osi przekroju (podłużny lub poprzeczny) łoża po implantacji. W przypadku przekroju wzdłuż osi implantu, stwierdzano niejednorodną budowę torebki łącznotkankowej. Wzdłuż brzegów implantów torebka była bardzo cienka o gładkich brzegach, ostro odgraniczona od mięśni. Torebka ta była zbudowana przede wszystkim z włókien klejorodnych i pojedynczych fibrocytów. Tkanka łączna wytworzona na końcach implantów, miała charakter bogatokomórkowej tkanki łącznej i była znacznie szersza, niż torebka wzdłuż boków implantów.

12, 26 i 32 tygodnie po implantacji obraz mikroskopowy był identyczny. W preparatach barwionych HE, widoczne były przestrzenie ograniczone bardzo cienkim, włóknistym, zbitym pasmem tkanki łącznej. Szerokość tego pasma stanowiła 1/6 szerokości włókna mięśni poprzecznie prążkowanych. W preparatach barwionych metodą van Gieson, opisywane pasmo barwiło się na kolor czerwony (ryc.5).

Grupa III - Ceramika porowata

Tydzień po implantacji w preparatach histologicznych, obserwowano szerokie pasmo bogatokomórkowej tkanki łącznej. Szerokość tego pasma wahała się od

4-10 przekrojów włókien mięśniowych. W wytworzonej torebce można było wyróżnić 2 warstwy. Od strony mięśni poprzecznie prążkowanych, miała ona charakter młodej tkanki łącznej z licznym 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 włókniaka (ryc.6).

4 tygodnie po implantacji w preparatach histologicznych z tkanek przylegających do implantu, obserwowano wytworzenie się pasma łącznotkankowego o nieregularnym przebiegu i zróżnicowanej budowie komórkowej. Miejscami opisywane pasmo było cienkie i zawierało przede wszystkim fibroblasty i liczne włókna klejorodne. W miejscach wnikania tkanki łącznej w pory ceramiki, jej budowa była bardziej luźna i bogatokomórkowa.

12 tygodni po implantacji w obrazie mikroskopowym, obserwowano wytworzenie się torebki łącznotkankowej o falistym przebiegu i utrzymującej się dwuwarstwowej budowie. Od strony mięśni poprzecznie prążkowanych miała ona charakter włóknisty i zawierała liczne, zbite, barwiące się na czerwono włókna klejorodne, uwidocznione w preparatach barwionych metodą van Gieson. W miejscu, gdzie tkanka wnikała w pory ceramiki, miała charakter bogatokomórkowej tkanki z komórkami typu limfocyta i makrofagów.

26 i 32 tygodnie po implantacji w preparatach histologicznych obraz mikroskopowy był podobny. Wytworzona torebka łącznotkankowa wokół implantu miała zróżnicowaną budowę. Od strony mięśni miała charakter tkanki zbitej, włóknistej i była ostro odgraniczona od mięśni poprzecznie prążkowanych. Od strony implantu jej przebieg był nieregularny, z licznymi wypustkami. Wypustki te u podstawy wykazywały szkliwienie i miejscami zawierały komórki chrzęstne. Miejscami była widoczna bogatokomórkowa tkanka łączna (ryc. 7).

Badania w mikroskopie skaningowym

Po 32 tygodniach przebywania w mięśniach szczura, na elektronogramach z powierzchni ceramiki litej obserwowano w jednym przypadku pojawienie się bardzo cienkiej blaszki kostnej, przez którą przeświecały ziarnistości powierzchni ceramiki (ryc.8). Na elektronogramach z powierzchni ceramiki litej silanowanej po 32 tygodniach przebywania w mięśniach szczura, obserwowano pojedyncze miejsca tworzenia się blaszek kostnych na jej powierzchni (ryc.9). Na elektronogramach z powierzchni ceramiki porowatej, po 32 tygodniach przebywania w mięśniach szczura, obserwowano dość liczne

miejsca tworzenia się blaszek kostnych, w bezpośrednim kontakcie z ceramiką (ryc.10).

OMÓWIENIE I DYSKUSJA

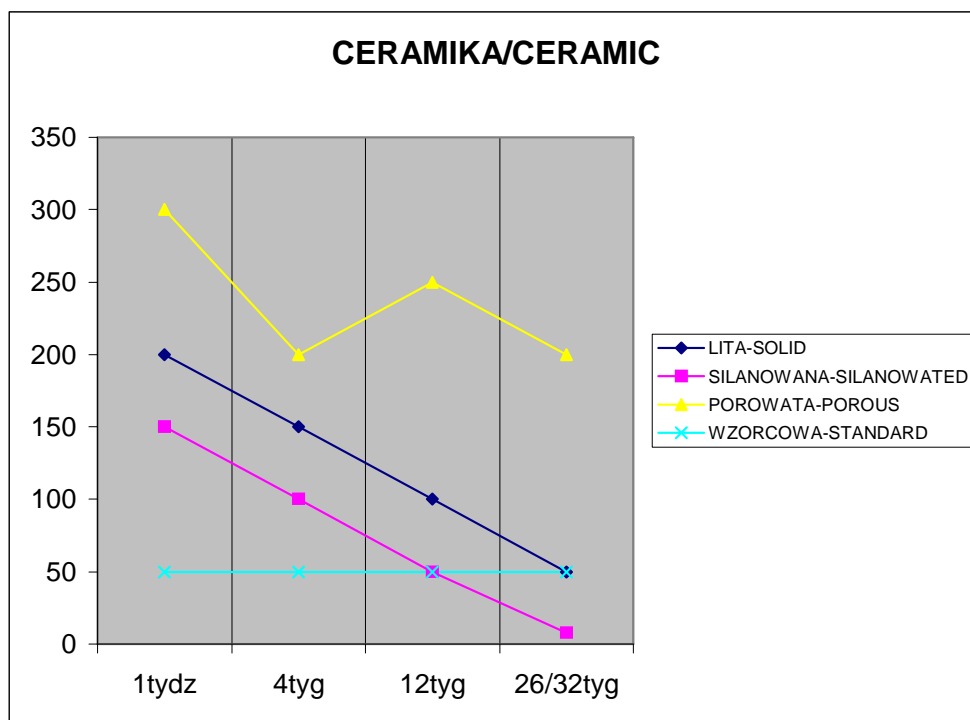
W badaniach patomorfologicznych po implantacji ceramiki litej i litej z potencjałem zeta (silanowanej) w tkanki miękkie wykazano, że już po tygodniu wytwarzała się cienka błonka z drobnymi naczyniami krwionośnymi. Po 32 tygodniach była ona nieznacznie grubsza. Wytworzona torebka silnie była zrośnięta z otaczającymi mięśniami, a od strony implantu przylegała do jego powierzchni. W przypadku implantów z ceramiki porowatej po tygodniu widoczny był wysięk włóknikowo-komórkowy, a wytworzona torebka łącznotkankowa była wyraźnie grubsza. Po 32 tygodniach po implantacji torebka była gruba, biaława, nieprzezroczysta, silnie zrośnięta z otaczającymi mięśniami. Od strony implantu wrastała w pory ceramiki, co powodowało przy próbie usunięcia implantu rozrywanie torebki. Podobny obraz makroskopowy stwierdzili inni autorzy [8, 21, 22].

Odczyn tkankowy ceramiki litej silanowanej jest porównywalny z odczynem na żywicę silikonową (wyroby z żywicy silikonowej nie ulegają zmianom degeneracyjnym, nawet po długim przebywaniu w tkankach). Wyroby te, zwłaszcza o gładkiej powierzchni, są ciałem obcym, wywołującym minimalny odczyn tkanek. W niektórych badaniach uznano nawet czystą żywicę silikonową, za materiał prawie niereaktywny dla tkanek i płynów ustrojowych.

Wykazane różnice makroskopowe w grubości i charakterze grubości torebki otaczającej implant, znalazły potwierdzenie w badaniach mikroskopowych. W badaniach patomorfologicznych wykazano, że zarówno w okresie wczesnym i odległym, charakter i wielkość odczynu tkankowego jest zależna od struktury powierzchni implantu. Ceramika porowata implantowana w tkanki miękkie wywoływała silniejszy odczyn zapalny, w którym wyróżniono dwie fazy:

- fazę wysiękową, manifestującą się występowaniem wysięku włóknikowo-komórkowego, który utrzymywał się do 12 tygodnia po implantacji w bezpośrednim sąsiedztwie ceramiki;
- fazę proliferacyjną, która doprowadziła do wytworzenia się torebki łącznotkankowej, oddzielającej implant od mięśni.

Odczyn tkankowy występujący wokół ceramiki litej, charakteryzował się krótszą i mniej nasiloną fazą wysiękową. W 4 tygodniu po implantacji, otaczało ją cienkie pasmo tkanki łącznej włóknistej. Jego grubość po 32 tygodniach od implantacji, nie przekraczała szerokości włókna mięśniowego. Ceramika lita silanowana wywoływała minimalny odczyn tkankowy, bez widocznej fazy wysiękowej. Po 32 tygodniach grubość torebki łącznotkankowej, wynosiła 1/6 szerokości włókna mięśniowego(wykres 1).



Wykres 1. Grubość torebki łącznotkankowej otaczającej implant dla trzech typów ceramiki, w zależności od terminu sekcji u szczurów

Graph 1. Thickness connectivetissue capsule surrounding implant for three types ceramics in dependences to rats section term-limit

Wyniki badań w mikroskopie skaningowym, po 32 tygodniach po implantacji w tkanki miękkie wykazały, że ceramika lita silanowana w porównaniu z ceramiką porowatą i ceramiką litą, powodowała wytwarzanie się bardzo cienkiego pasma tkanki łącznej z minimalnymi zmianami wstecznymi, objawiającymi się powstawaniem ognisk szkliwienia, wapnienia i tkanki kostnej.

Pomimo znacznego postępu w stosowaniu materiałów biologicznych w implantologii do uzupełniania ubytków tkanek miękkich, i tkanki kostnej, dużą rolę odgrywają implanty bioceramiczne. Stawia to przed tymi materiałami znaczne wymagania zarówno pod względem struktury, jak i odczynów biologicznych. Dążenie do uzyskania jak największej biozgodności w ostatnich latach, spowodowało znaczne zainteresowanie się badaczy zjawiskami elektrokinetycznymi, zachodzącymi na powierzchni implantów i na granicy faz implant/płynny ustrojowe. Szczegółowe poznanie tych zjawisk, być może pozwoli na określenie wpływu pól elektrycznych na procesy chorobowe w organizmach ludzkich.

WNIOSKI

1. Charakter i wielkość odczynu tkankowego jest zależna od struktury powierzchni implantów.
2. Wokół ceramiki porowatej stwierdzono najsilniejszy odczyn w tkankach miękkich, manifestujący się obfitą długotrwałą fazą wysiękową, z wytworzeniem grubej torebki łącznotkankowej.
3. Określony potencjał zeta wprowadzony na powierzchnię ceramiki, wpływa na proces osteoindukcji, wywołując minimalny odczyn zapalny.

LITERATURA

- [1] Lee Amipour M., Pishko M.: Influence of biomaterial Microstructure on Citokine Secretion by Macrophages. Texas A and M University, Department of Chemical Engineering, College Station, (2000) 1-2.
- [2] Pierschbacher M.D., Hayman E.G., Ruoslahti E.: Location of the cell attachment site in fibronectin with monoclonal antibodies and proteolytic fragments of the molecule. Cell (1998) 226-259.
- [3] Zboromirska-Wnukiewicz B., Wnukiewicz J., Sokołowski A., Pietras M.: Potencjał elektrokinetyczny w układach płyny ustrojowe/implanty. Prace Naukowe Instytutu Technologii organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej. Konferencje nr 22, (2000) 249-252.
- [4] Ricci J.L. et al.: Hydroxyapatite ceramics and nature of the bone-ceramic interface. Bull. Hospital. J. Diseases Ort. Inst., (1989) 49, 178-191.
- [5] Tredway W.K., Risband S.H.: J.Nou. Crystal. Solids 1988, 100, 278-283.
- [6] Zboromirska-Wnukiewicz B., Zubiński J., w: Materiały kompozytowe-właściwości, wytwarzanie, zastosowanie, I Konf. Naukowa, Prace Nauk. Inst. Budownictwa Pwr, Ser. Konferencje, Wrocław 1997.
- [7] Hench L.L.: Bioceramics. J. Am. Ceram. Soc. 81. (1998) 21-32.
- [8] Badura R., Buczek A., Kotz J. i in.: Badania biogodności nowej generacji cementów kostnych. Szkło i Ceramika (1998) 6, 64-70.
- [9] Zboromirska-Wnukiewicz B., Gasperowicz A., Cibis E., Gancarek Z.: Ceramiczne nośniki do immobilizacji drobnoustrojów w procesach fermentacyjnych. Prace Naukowe Instytutu Budownictwa Politechniki Wrocławskiej (1999) 75, 25-40.
- [10] Zboromirska-Wnukiewicz B., Gasperowicz A., Wnukiewicz J., Sokołowski A.: Modyfikacja powierzchni tworzyw bioceramicznych poprzez zmianę ich potencjału zeta do zastosowań w chirurgii. Annales Academiae Medicae

Silensis, Materiały IV Konferencji: Biomateriały i mechanika w stomatologii. (2000) 321-326.

[11] Holmes R.E. et al.: Bone regeneration in onlay replemineform hydroxypatie implants. Biomed. Mater. Res. Symp. Trans. , (1978) 2, 180-181.

[12] Overgaard S., Lind M., Glerup H., Grundvig S., Bunger C., Soballe K.: hydroxyapatite and fluoropatie coatings for fixation of weight loaded implants. Clin. Orthop. (1997) 336: 286-296.

[13] Summer D.R., Galante J.O.: Evarts C.M., editors. Sugery of the musculoskeletal System. 2 nd. Ed. New York: Churchill Livingstone (1990) 151-176.

[14] Zboromirska-Wnukiewicz B., Sokołowski A., Wnukiewicz J., Staniszevska-Kuś J.: Potencjały elektrokinetyczne na granicy faz: implant-płynny ustrojowe. Inżynieria biomateriałów (2001) 13, 12-15.

[15] Davis S.E., et al.: Biocompatibility of ceramic implants in soft tissues. J. Biomed. Mater. Res. (1972) 6, 425-444.

[16] Kuś H. Biomateriały. T.4., Polska Akademia Nauk, (1990) 1, 4-5.

[17] Boyan B. et. al.: Bioactive glasses, aluminium oxide titanium. Biochemistry of the interface. Ann IV.Y. Acad. Sci. (1988) 523, 262-267

[18] Drzymała J.: Podstawy mineralurgii. Rozdział 12 Flotacja. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej. Wrocław 2001, 230-365.

[19] Zboromirska-Wnukiewicz B., Sokołowski A., Wnukiewicz J.: Electric phenomena occurring on phase boundaries of the ceramic material and tissue cells. Przegląd Elektrotechniczny LXXVII. Zeszyt Specjalny (2001) 336-339.

[20] Staniszevska-Kuś J., Paluch D., Pielka S., Ślósarczyk A., Garcarek J.: Zastosowanie dwufazowej ceramiki hydroksyapatytowej i whitelockitowej jako materiału osteoindukcyjnego. Badania doświadczalne. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej. Acta of Bioengineering and Biomechanics. Vol. 3, Supplement 1, (2001) 221-230.

[21] Hulbert S.F. et al.: Tissue reaction to three ceramics of porous and structures. J. Biomed. Mater. Res., (1992) 6, 347-374.

[22] Zboromirska-Wnukiewicz B., Wnukiewicz J., Sokołowski, Staniszevska-Kuś J., Lewandowski R.: Low – Porous Bioceramics as an Implantation Material. Zeszyt Specjalny Przeglądu Elektrotechnicznego. APTADM' (2001) LXXVII, 336-339.

Adres autorów:

Zakład Chirurgii Eksperymentalnej
i Badania Biomateriałów AM
50-352 Wrocław
ul. Poniatowskiego 2

Ryc.1.Grupa I. Obraz makroskopowy tydzień po implantacji ceramiki litej w mięśnie grzbietu szczura. Widoczne implanty wewnątrz mięśni. Na powięzi drobne wybroczyny krwawe

Fig.1. Group I. Macroscopic picture one week after implantation of solid ceramics into rat's muscles. Visible implants of inside muscles. On fascia of muscle tiny bloody ecchymosis

Ryc.2.Grupa II. Obraz makroskopowy 26 tygodni po implantacji ceramiki litej silanowanej w mięśnie grzbietu szczura

Fig. 2. Group II. Macroscopic picture 26 weeks after implantation of solid silano-vated ceramics into back's muscle of rat

Ryc. 3.Grupa III. Obraz makroskopowy 12 tygodni po implantacji ceramiki porowatej w mięśnie grzbietu szczura. Po stronie prawej widoczna biała torebka pokrywająca implant

Fig.3. Group III. Macroscopic picture 12 weeks after implantation of porous ceramics into back's muscle of rat in right side. Visible white capsule covered implant

Ryc. 4. Grupa I. Obraz mikroskopowy 32 tygodnie po implantacji ceramiki litej w mięśnie grzbietu szczura. Widoczne bardzo cienkie włókniste pasmo tkanki łącznej ograniczające od góry przestrzeń po usuniętym implancie. U góry i po lewej mięśnie poprzecznie prążkowane. Barw. van Gieson. Pow. 140 x

Fig. 4. Group I. Microscopic picture 32 weeks after implantation of solid ceramics into back's muscle of rat. Visible very thin fibrous connective tissue strand in upper limited space after removed implant. In upper and left crosswise striped muscles. Dying van Gieson Mag. 140 x

Ryc. 5. Grupa II. Obraz mikroskopowy 12 tygodni po implantacji ceramiki litej silanowanej w mięśnie grzbietu szczura. Po lewej przestrzeń po implantacji ograniczona cienkim włóknistym pasmem łącznotkankowym. Barw. HE. Pow. 140 x

Fig. 5. Group II Microscopic picture 12 weeks after implantation of solid silanovated ceramics into back's muscle of rat. On the left visible the space after removed implant, surrounded by thin, fibrous layer of connective tissue. Dying.HE. Mag. 140 x

Ryc. 6. Grupa III. Obraz mikroskopowy tydzień po implantacji ceramiki porowatej w mięśnie grzbietu szczura. U dołu mięśnie poprzecznie prążkowane do których przylega bogatokomórkowa tkanka łączna. Barw. HE. Pow. 140 x

Fig. 6. Group III. Microscopic picture 1 week after implantation of porous ceramic into back's muscle of rat. At the bottom crosswise striped muscles in which adhering rich-cell connective tissue. Dying HE. Mag.140 x

Ryc. 7. Grupa III. Obraz mikroskopowy 32 tygodnie po implantacji ceramiki porowatej w mięśnie szczura. Widoczne nieregularne wypustki zbudowane z tkanki łącznej włóknistej, u podstawy której widoczne są chondroblasty oraz tkanka chrzęstna. U dołu widoczne mięśnie poprzecznie prążkowane. W lewym górnym rogu przestrzeń po usuniętym implantcie. Barw. van Gieson. Pow. 140 x

Fig. 7. Group III. Microscopy picture 32 weeks after implantation of porous ceramic into back muscles of rat. Visible irregular erected edgings with fibrous connective tissue, in which basis there are visible chondroblasts and chondroid tissue. At the bottom crosswise striped muscles. In upper are visible left side corner space after removed implant. Dying van Gieson. Mag. 140 x

Ryc. 8. Elektronogram wykonany z powierzchni ceramiki litej po 32 tygodniach przebywania w mięśniach. Widoczne cienkie pasmo tkanki kostnej przebiegające po przekątnej. Pow. 2000 x

Fig. 8. Electronogramme made from surface of solid ceramic 32 weeks after implantation into muscles. Visible osseus tissue layer running across. Mag. 2000 x

Ryc. 9. Elektronogram z powierzchni ceramiki litej silanowanej po 32 tygodniach przebywania w mięśniach. W dolnym lewym rogu widoczna tkanka kostna. Pow. 500 x

Fig. 9. Electronogramme made from surface of solid silanovated ceramic's 32 weeks after implantation into muscles. In down left corner visible osseus tissue. Mag. 500 x

Ryc. 10. Elektronogram z powierzchni ceramiki porowatej po 32 tygodniach przebywania w mięśniach szczura. W lewej części widoczne tworzące się blaszki kostne. Pow. 50 x

Fig. 10. Electronogramme made from surface porous ceramic's 32 weeks after implantation into rat's muscles. In left part visible ossal thin plate. Mag. 50 x
