

aktywności ruchowej stwierdza się lepszą ekonomikę pracy mięśni.

4. Intensywna rekreacja ruchowa wpływa korzystnie na obie kończyny, (choć nieco silniej na aktywność bioelektryczną kończyny zdrowej), powodując efektywniejszą pracę mięśni w przypadku zwiększającej się intensywności wysiłku.

5. Istnieje konieczność porównania uzyskanych wyników z wynikami chorych, których przerwane ścięgna Achillesa łączono innymi materiałami.

6. Otrzymane wyniki badań nie zawsze potwierdzały indywidualne odczucia badanych, co do stanu funkcjonalnego operowanej kończyny.

7. Koniecznym jest objęcie dalszymi badaniami osób bezpośrednio po usunięciu unieruchomienia, celem monitorowania układu ruchu w początkowym okresie rehabilitacji. Okres ten może charakteryzować się najbardziej dynamicznymi, korzystnymi dla kończyny zmianami.

effort intensity.

5. It is necessary to compare the obtained results with other cases when the ruptured Achilles tendon was repaired with different materials.

6. The obtained results were not always in agreement with individual feelings of patients about functioning of the operated limb.

7. It is necessary to include in the tested group patients directly after removal of the immobilising dressing in order to monitor the motor system at the initial stage of rehabilitation. This early period may be characterised by the most dynamic changes advantageous for the limb.

## Piśmiennictwo

- [1] Bober T., Hay J.G.: Topografia siły mięśni kończyn człowieka. Wychowanie Fizyczne i Sport, 3, 1990.
- [2] Bosco C., Tarkka I., Komi PV.: Effect of elastic energy and myoelectrical potentiation of triceps surae during stretch-shortening cycle exercise. Int. J. Sports Med., 3, (1982), 137-40.
- [3] Doński D.D.: Biomechanika ćwiczeń fizycznych. Sport i Turystyka, Warszawa, 1963.
- [4] Dziak A.: Zamknięte uszkodzenia tkanek miękkich narządu ruchu. PZWL, Warszawa, 1985.
- [5] Finni T., Komi PV., Lukkariniemi J.: Achilles tendon loading during walking: application of a novel optic fiber technique. Eur. J. Appl. Physiol., 77, (1998), 289-91.
- [6] Garlicki J., Kuś W.M.: Traumatologia Sportowa. Wyd. I. PZWL, Warszawa 1978.
- [7] Garlicki M.: Chirurgia urazowa. Wyd. I, PZWL, Warszawa 1987.
- [8] Hausmanowa-Petrusewicz I.: Elektromiografia kliniczna. PZWL, Warszawa 1986.
- [9] Komi PV., Bosco C.: Utilization of stored elastic energy in leg extensor muscles by men and women. Med. Sci. Sports Winter; 10, (1978), 261-5.
- [10] Morecki A., Ekiel J., Fidelus K.: Bionika ruchu. PWN, Warszawa, 1971.

## References

- [11] Nikitin GD., Lyskovets-Chernetskaia L.E., Linnik S.A.: Treatment of Achilles tendon injuries in athletes. Vestn. Khir., 123, (1979), 84-8.
- [12] Raunest J., Burrig K.F., Derra E.: Pathogenesis of Achilles tendon rupture. Chirurg, 61, (1990), 815-9.
- [13] Ruchlewicz T., Staszkiwicz R., Chwała W., Nosiadek L.: Spadek siły i wytrzymałość w warunkach skurczu izometrycznego. Biology of Sport, Volume 15, 1998.
- [14] Russe O.A., Gerhardt J.J.: International SFTR method of measuring and recording motion. Bern, Stuttgart, Wien, H. Hubert Publishers, 1975.
- [15] Rylko A.: Metody analizy statystycznej. Wydawnictwo Skrytowe AWF Kraków, nr 104, 1989.
- [16] Szopa J., Chwała W., Ruchlewicz T.: Identification structure and validity of testing of motor abilities, Journal of Human Kinetics. Kraków 1999.
- [17] Thermann H., Frerichs O., Biewener A., Krettek C., Schandelmaier P.: Biomechanical studies of human Achilles tendon rupture. Unfallchirurg, 98, (1998), 570-5.
- [18] Tylman D., Dziak A.: Traumatologia Narządu Ruchu. T.2, cz. 2, Wyd. I, PZWL, Warszawa, 1987.

## BIOTOLERANCJA IMPLANTÓW ZE STALI AISI 316L Z WARSTWAMI PASYWNYMI I PASYWNO - DIAMENTOWYMI

BOGDAN KOCZY\*, JAN MARCINIAK\*\*

\* SAMODZIELNY PUBLICZNY WOJEWÓDZKI SZPITAL CHIRURGII  
URAZOWEJ W PIEKARACH ŚLĄSKICH  
\*\* ZAKŁAD INŻYNIERII MATERIAŁÓW BIOMEDYCZNYCH  
POLITECHNIKI ŚLĄSKIEJ W GLIWICACH

### Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań biotolerancji implantów metalicznych ze stali AISI 316L uszlachetnionych warstwami pasywnymi i pasywno - diamentowymi w doświadczeniach na modelach zwierzęcych jakim były

## BIOTOLERANCE OF IMPLANTS FROM THE AISI 316L STEEL WITH THE PASSIVE AND PASSIVE - DIAMOND COATINGS

BOGDAN KOCZY\*, JAN MARCINIAK\*\*

\* INDEPENDENT PUBLIC PROVINCIAL HOSPITAL FOR THE TRAUMATIC  
SURGERY IN PIEKARY ŚLĄSKIE  
\*\* DIVISION OF BIOMEDICAL MATERIALS ENGINEERING, SILESIAN  
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY IN GLIWICE

### Abstract

Results of biotolerance investigations are presented of the metallic implants from the AISI 316L steel improved with the passive and passive-diamond coatings in experiments on the animal models fea-

świnki morskie. Badania miały na celu wykazanie przydatności tego materiału dla chirurgii urazowo - ortopedycznej i szczękowo - twarzowej. Doświadczenia przeprowadzono według zaleceń normy ASTM 981-86. Implanty wszczepiono do tkanek podskórnych, mięśniowych i kostnych zwierząt. Obserwacje histopatologiczne tkanek zwierząt grupy kontrolnej i doświadczalnej prowadzono po okresach 12, 26 i 52 tygodni. Oprócz badań tkanek okołowszczepowych prowadzono także badania histopatologiczne tkanek mięszo-wych organów detoksykacyjnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że warstwy pasywne i pasywno - diamentowe, wytworzone sposobem opracowanym w Zakładzie Materiałów Biomedycznych Politechniki Śląskiej oraz Zakładzie Materiałów Cienkowarstwowych Politechniki Łódzkiej cechują dobre właściwości zaporowe. Blokują skutecznie inicjację i rozwój korozji implantów, a w konsekwencji infiltrację jonów metalicznych do tkanek. Uzyskane wyniki są więc obiecujące do zastosowań wymienionych biomateriałów metalicznych dla praktyki klinicznej w chirurgii rekonstrukcyjnej, a w szczególności urazowo - ortopedycznej oraz szczękowo - twarzowej.

**Słowa kluczowe:** biomateriały metaliczne, stal austenityczna, badania doświadczalne, histopatologia, biotolerancja.

## Wprowadzenie

Stal austenityczna Cr-Ni-Mo jest pospolitym biomateriałem metalicznym stosowanym na implanty krótkotrwałe w chirurgii rekonstrukcyjnej (traumatologii, ortopedii, torakochirurgii, szczękowo - twarzowej, kardiologii zabiegowej) oraz protetyce stomatologicznej i ortodontji. Jest najtańszym biomateriałem metalicznym lecz jej odporność korozyjna nie jest w pełni zadowalająca [1-4]. Skład chemiczny tej stali został ustalony na podstawie długoletnich obserwacji klinicznych, a przede wszystkim oceny biotolerancji w środowisku tkanek i płynów ustrojowych [4]. W zakresie przyjętej tolerancji pierwiastków stopowych, które występują w stali zagwarantowana jest struktura austenityczna, paramagnetyczna, a zespół własności mechanicznych w pełni dla różnych stanów umocnienia, gwarantuje zespół własności użytkowych (wytrzymałościowych i ciągliwości) dla wszelkich postaci implantów i techniki operacyjnej stosowanej w chirurgii rekonstrukcyjnej [5]. Problemem wciąż pozostaje niezadowalająca biotolerancja, której nie można zwiększyć przez modyfikację składu chemicznego i fazowego stali. Biotolerancję implantów z tej stali jest ściśle związana z odpornością korozyjną można zwiększyć poprzez uszlachetnianie ich powierzchni warstwami o dobrej adhezji, odporności korozyjnej i podatnymi do odkształcania [6]. Kwestią tą zajmują się liczne ośrodki inżynierii powierzchni. Szczególnie korzystnie prezentują się wyniki badań uzyskane w zakresie implantów uszlachetnionych powłokami pasywnymi i pasywno - diamentowymi. Wielokrotnie badania prowadzone w Instytucie Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych Politechniki Śląskiej wykazały prawie trzy krotny wzrost odporności implantów z tej stali pokrytej wymienionymi warstwami na korozję wżerową, dobrą odporność na korozję szczelinową i naprężeniową [7-9]. Kolejna faza badań oceny jakości tych biomateriałów wymaga więc badań biotolerancji w tkankach zwierząt doświadczalnych, co stanowiło cel kolejnych badań.

by guinea-pigs. The purpose was to demonstrate their applicability in the traumatic-orthopaedic and maxillofacial surgery. The experiments were carried out according to the ASTM 981-86 standard. The implants were inserted into the subcutaneous, muscular, and osseous tissues of the animals. Histopathological observations of tissues of the animals from the control and experimental groups were carried out after 12, 26 and 52 weeks. Apart from examination of the peri-implant tissues, the histopathological examinations were also made of the parenchymatous tissues of the detoxication organs.

Basing on these experiments, one can state that the passive and passive-diamond coatings deposited according to the method developed in the Division of Biomedical Materials Engineering of the Silesian University of Technology and in the Division of Thin-Layer Materials of the Technical University of Łódź have good barrier properties. They effectively block the initiation and development of the implant corrosion, and in consequence, infiltration of metal ions into the tissues. The obtained results are thus promising for application of the aforementioned metallic biomaterials in the clinical practice for the reconstructive surgery, and particularly for the traumatic-orthopaedic and maxillofacial surgery.

**Key words:** metallic biomaterials, austenitic steel, experimental investigations, histopathology, biotolerance.

## Introduction

The Cr-Ni-Mo austenitic steel is a common metallic biomaterial used for the short-term implants in the reconstructive surgery (traumatology, orthopaedics, thoracosurgery, maxillofacial surgery, operative cardiology) and in the dental prosthetics and orthodontics. It is the least expensive metallic biomaterial, however its corrosion resistance is not fully satisfactory [1-4]. The chemical composition of this steel has been established basing on long-term clinical observations, and first of all on the evaluation of its biotolerance in the environment of body tissues and fluids [4]. Within the accepted tolerance range of alloying elements, the austenitic paramagnetic structure of the steel is guaranteed, and its mechanical properties at various strengthening states ensure good useful properties (strength and ductility) for all types of implants and operation techniques used in the reconstructive surgery [5]. There is one problem however, i.e. inadequate biotolerance, that cannot be improved by modification of chemical and phase composition. Biotolerance of implants made of this steel, which is closely connected with the corrosion resistance, can be improved by surface modification with coatings having good adhesion, corrosion resistance and deformability [6]. This problem has been studied in many laboratories dealing with surface engineering. The results of investigations obtained in the area of implants improved by passive and passive-diamond coatings are particularly advantageous. Multiple investigations carried out at the Institute of Engineering Materials and Biomaterials of the Silesian University of Technology demonstrated a nearly tripled pitting corrosion resistance of implants coated with the above-mentioned layers, as well as good crevice and stress corrosion resistance [7-9]. The next phase of evaluation of these biomaterials, i.e. biotolerance tests in the experimental animal tissues, was the goal of the present investigations.

Badano biotolerancję implantów wykonanych ze stali AISI 316 L, pochodzących z losowo wybranego wytopu o składzie chemicznym i strukturze oraz własnościach mechanicznych zgodnych z wymaganiami normy PN - ISO 5832-1.

Badaniom poddano implanty w postaci krążków o średnicy 5,0 mm i grubości 1,0 mm, o masie  $0,750 \pm 0,010$  g. Krążki wycinano z prętów o średnicy 6,0 mm. Krążki były polerowane elektrolitycznie i spasywowane chemicznie dla grupy zwierząt kontrolnych, a dla grupy zwierząt badawczych dodatkowo pokryte zostały warstwą nanokrystalicznego węgla. Metoda polerowania elektrolitycznego i pasywacji została opracowana w Zakładzie Inżynierii Biomateriałów Politechniki Śląskiej. Do polerowania elektrochemicznego zastosowano elektrolit odmienny od powszechnie stosowanego kwasu ortofosforowego i bezwodnika kwasu chromowego. Warunki polerowania elektrochemicznego i pasywacji chemicznej zdecydowanie zwiększyły potencjały przebicia warstwy pasywnej [9]. Z kolei warstwa diamentowa nanoszona była metodą RFPCVD opracowaną w Zakładzie Materiałów Cienkowarstwowych Politechniki Łódzkiej. Ogólnie metoda wytwarzania warstwy pasywno - diamentowej zastrzeżona została patentem [10].

Do badań użyto świnek morskich, a więc zwierząt, wykazujących podobną reaktywność w zakresie odczynów toksykologicznych i alergicznych do człowieka [11-13]. W grupie kontrolnej i badawczej użyto po 12 świnek morskich, po połowie samców i samic w każdej grupie. Zwierzęta pochodziły z hodowli Centralnej Zwierzętarni Śląskiej Akademii Medycznej. Przeciętny wiek zwierząt wynosił 6 miesięcy, a przeciętna waga zwierzęcia ok. 400 g. Zwierzęta podzielone zostały na grupy - TABELA 1.

U wszystkich zwierząt, na których wykonano zabieg przeprowadzono premedykację, podając im domięśniowo kataminę, a następnie uśpiono je eterem. Przed wykonaniem za-

biegu dokładnie ogolono skórę w miejscu wykonania nacięcia. Zabieg przeprowadzono dwoma zestawami jałowymi narzędzi po uprzednim przemyciu skóry benzyną i odkażeniem jej jodalkoholem. Pierwszym zestawem przecinano skórę i mięśnie u wszystkich zwierząt, a drugim wprowadzono po 2 krążki do tkanki podskórnej w okolicy międzyłopatkowej i do mięśni piersiowych.

Wszczepienie jednego krążka do kości piszczelowej wykonano w następujący sposób: z cięcia prostego nad przednią krawędzią piszczeli odsunięto do boku grupę mięśni strzałkowo - piszczelowych i odsłonięto od strony strzałkowej bliższą nasadę kości piszczelowej. Wiertłem stomatologicznym wykonano rynnę w kości długości 5-6 mm, szerokości 1 mm, obejmującą część zbitą i gąbczastą kości. Do przygotowanej rynny wkładano krążek metalowy, umieszczając go częściowo w kanale szpikowym, jak i w części zbitej kości.

Przez cały okres doświadczenia prowadzono obserwacje kliniczne zwierząt, a przed ich uśmierceniem wykonano w znieczuleniu ogólnym radiogramy świnek morskich z wszczepionymi krążkami. Zwierzęta wszystkich grup po za-

Biotolerance was investigated on implants made of the AISI 316L steel, from randomly selected melt, with the chemical composition and structure, as well as mechanical properties, conforming to the PN-ISO 5832-1 standard.

Experiments were made with implants in the form of disks, 5.0 mm in diameter and 1.0 mm thick, with  $0.750 \pm 0.010$  g mass. The disks were cut from steel rods, 6.0 mm in diameter. The disks were electrolytically polished and chemically passivated for the control group of animals, and for the experimental group of animals they were in addition coated with a layer of nanocrystalline carbon. The method of electrolytic polishing and passivation was developed in the Division of Biomedical Materials Engineering of the Silesian University of Technology. For the electrolytic polishing, another electrolyte was used, not the common orthophosphoric acid and chromic acid anhydride. Conditions of the electrochemical polishing and chemical passivation raised significantly the breakdown potentials of the passive coating [9]. Next, a diamond coating was deposited by the RFPCVD method developed in the Division of Thin-Layer Materials of the Technical University of Łódź. The method of manufacturing the passive-diamond coating has been patented [10].

Guinea pigs were used in the experiments, as animals displaying similar reactivity in respect to toxicological and allergic reactions as that of humans [11-13]. Twelve guinea pigs were used in each group, the control and experimental one, with half males and females in each group. The animals came from the Central Animal Farm of the Silesian Medical Academy. The average age of these animals was 6 months and their average weight was about 400 g. The animals were divided into the groups as listed in TABLE 1.

Ilość tygodni po zabiegu Number of weeks after operation	Ilość świnek, grupa kontrolna Number of guinea pigs - control group	Ilość świnek, grupa badana Number of guinea pigs - experimental group
12	4	4
26	4	4
52	4	4

TABELA 1. Liczba zwierząt kontrolnych i doświadczalnych.  
TABLE 1. Number of control and experimental animals

Premedication was carried out on all animals on which operation was done, by intramuscular administering of catamine, and afterwards they were anaesthetised with

ether. The skin in the incision area was shaved carefully before the operation. The operation was done using two sets of sterile instruments after washing the skin with benzine and disinfecting it with iodine. The first set of instruments was used for cutting the skin and muscles of all animals, and the second one was used for inserting 2 discs into the subcutaneous tissue in the interscapular zone and into the pectoral muscles.

Implantation of one disc into the tibial bone was made in the following way: from the straight cut over the front edge of the tibial bone, the group of the fibular and tibial muscles was moved aside and the proximal epiphysis of the tibial bone was exposed. The dental drill was used for making a groove in the bone, about 5-6 mm long, and 1 mm wide, encompassing the compact and spongy bone parts. The metal disc was inserted into the prepared groove, and placed partly in the marrow cavity and partly in the compact part of the bone.

Clinical observations of the animals were carried out for the entire time span of the investigations, and before their sacrificing, in general anaesthesia the radiograms were

kończonym okresie obserwacji uśmiercano przez skrwawienie z tętnic biodrowych w oszołomieniu eterowym. Z miejsc operowanych pobierano wycinki do badań histopatologicznych. Usunięto również wszczepione krążki i przekazano je do badań metalograficznych celem obserwacji uszkodzeń korozyjnych. Dodatkowo pobrano wycinki z następujących organów wewnętrznych: wątroby, nerek, płuc i śledziony. Wycinki z kości poddano demineralizacji w 7% roztworze kwasu azotowego przez 14 dni. Pozostałe wycinki utrwalono w 10% roztworze formaliny. Cały materiał opracowano metodą parafinową, krojąc na mikrotomie skrawki o grubości  $6\ \mu\text{m}$ , które następnie zabarwiono metodą rutynową. Preparaty obserwowano na mikroskopie świetlnym skaningowym i mikroanalizatorze rentgenowskim. Badania histopatologiczne przeprowadzono w Zakładzie i Katedrze Patomorfologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze.

## Wyniki badań

Po wykonaniu zabiegu operacyjnego zwierzęta pozostawiono do wybudzenia. U żadnego zwierzęcia w obserwacjach codziennych nie stwierdzono procesu zakażenia poporacyjnego rany. W grupach: kontrolnej i badanej nie stwierdzono różnic w zachowaniu się zwierząt.

Badania radiologiczne wykazały prawidłowe wstawienie krążków. Nie stwierdzono również odczynów ani zmian w obrazie rtg wokół krążków. Po upływie jednego miesiąca stwierdzono całkowitą przebudowę tkanki w wykonanych rynnach kostnych. Badania histopatologiczne prowadzone dla zwierząt grupy kontrolnej i badawczej po 12, 26 i 52 tygodniach zgodnie z zaleceniami normy ASTM 981-86 [14].

W grupie kontrolnej po 12 tygodniach w badaniach histopatologicznych w podskórnej tkance tłuszczowej stwierdzono wokół wszczepów cienką torebkę łącznotkankową. W warstwie zewnętrznej wyróżniono liczne fibroblasty, a także nieliczne włókna kolagenowe. Zewnętrzna warstwa natomiast zawierała szklawiejące ogniskowo włókna kolagenowe.

Po 26 tygodniach wokół wszczepów wytworzyła się dobrze wykształcona torebka łącznotkankowa zbudowana z licznych włókien kolagenowych oraz fibrocytów.

Po 52 tygodniach wokół wszczepów wytworzyła się gruba torebka łącznotkankowa z cechami szklawienia włókien kolagenowych bez zmian morfologicznych w obszarze tkanek otaczających torebkę - RYS. 1.

W mięśniach po 12 tygodniach w tkankach wokół wszcze-

taken of the guinea pigs with the implanted disks. The animals from all groups were sacrificed after completion of the observation period by exsanguination from the iliac artery in the light ether anaesthesia. Specimens were taken from the operated places for histopathological examinations. Implanted disks were removed also and passed to metallographic examination of corrosion damages. In addition, specimens of the following internal organs were taken: liver, kidneys, lungs, and spleen. The bone specimens were demineralized in a 7% nitric acid solution for 14 days. Other specimens were fixed in 10% formalin solution. The entire material was worked out using the paraffin method, slicing the microtome sections  $6\ \mu\text{m}$  thick and routine staining. The specimens were examined by means of light scanning microscope and in the X-ray micro-analyser.

The histopathological examinations were made in the Division and Chair of Pathomorphology of the Medical Academy in Zabrze.

## Results

After the operation the animals were left for awakening. In the daily observations no animal revealed postoperative infecting of the wound. No differences were noticed in behaviour of animals in the control and experimental groups.

The radiological examination revealed correct insertion of the discs. No reactions or lesions were found either in the X-ray image around the discs. After one month, total texture restructuring was observed in the grooves. The histopathological examinations were carried out on animals from the control and experimental groups alike after 12, 26 and 52 weeks, according to the recommendations of the ASTM 981-86 standard [14].

In the control group after 12 weeks, in the histopathological examinations, a thin connective tissue capsule in the subcutaneous fatty tissue was found around the implants. In the outer layer, numerous fibroblasts were found, and also some collagen fibres. The outer layer, however, contained the focally hyalinising collagen fibres.

After 26 weeks, a properly developed connective tissue capsule formed, composed of multiple collagen fibres and fibrocytes.

After 52 weeks, a thick connecting tissue capsule developed around the implants, with traits of hyalinising collagen fibres and no morphological changes in the area of tissues surrounding the capsules - FIG. 1.

In muscles, after 12 weeks, in tissues around the implants,



RYS. 1. Tkanka podskórna. Struktura ścianki torebki. Wszczep spasywowany po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 400x).

FIG. 1. Subcutaneous tissue. Structure of the capsule wall. Implant with the passive layer after 52 weeks of using (H&E, 400x).



RYS. 2. Tkanka podskórna. Struktura ścianki torebki. Wszczep spasywowany po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 400x).

FIG. 2. Subcutaneous tissue. Structure of the capsule wall. Implant with the passive layer after 52 weeks of using (H&E, 400x).

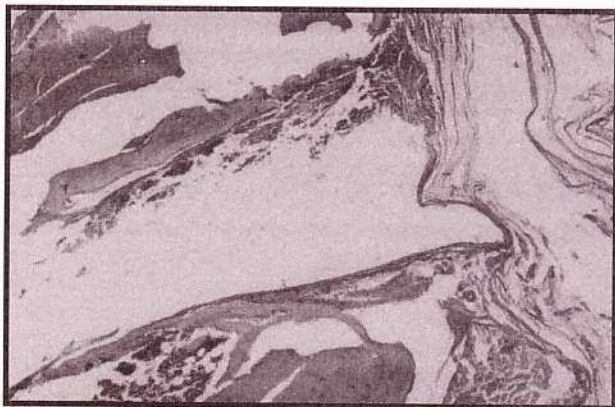
pów wytworzyła się wyraźna torebka łącznotkankowa zawierająca liczne komórki o cechach dojrzałych fibrocytów z nielicznymi włóknami kolagenowymi ułożonymi podłużnie. Nie stwierdzono zmian morfologicznych w otaczających torebki mięśniach. Po 26 tygodniach w otoczeniu wszczepów stwierdzono średnio grube torebki łącznotkankowe zawierające liczne włókna kolagenowe i nieliczne fibrocyty. Nie stwierdzono także zmian morfologicznych w otaczających torebki mięśniach.

Po 52 tygodniach z kolei wokół wszczepów stwierdzono cienkie i zeszkliwione torebki łącznotkankowe bez zmian w otaczających mięśniach - RYS. 2.

W tkance kostnej po 12 tygodniach wokół wszczepów wytworzyły się grube torebki łącznotkankowe zawierające podłużnie przebiegające włókna kolagenowe i fibrocyty o dużych jądrach komórkowych. W tkankach kostnych, gąbczastych wyróżniono cechy odbudowy.

Po 26 tygodniach w otoczeniach wszczepów wykazano obecność grubych i nieregularnych torebek złożonych z bardzo licznych fibrocytów i nielicznych włókien kolagenowych. W ich składzie stwierdzono także dojrzałe tkanki kostne.

Po 52 tygodniach w pobliżu wszczepów stwierdzono cienkie torebki łącznotkankowe przylegające ściśle do przebudowanych kości - RYS. 3. Torebki zbudowane były z nielicznych fibrocytów i delikatnych, podłużnych włókien kolagenowych. W strukturach kości wyróżniono grube beleczki kostne zawierające dość liczne osteocyty i niewielkie, owal-



**RYS. 3.** Kość. Cienka torebka łącznotkankowa przylegająca do kości. Wszczep spasywowany po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

**FIG. 3.** Bone. Thin connective tissue capsule adjacent to the bone. Implant with the passive layer after 52 weeks of using (H&E, 100x).

ne przestrzenie między beleczkowe z licznymi, drobnymi naczyńcami.

W grupie badanej po 12 tygodniach w tkance podskórnej, tłuszczowej tkance łącznej wytworzyły się wokół wszczepów dość grube torebki łącznotkankowe zbudowane z delikatnej tkanki łącznej. Warstwa wewnętrzna zawierała liczne fibroblasty i fibrocyty oraz mniej liczne włókna kolagenowe. Natomiast w warstwach zewnętrznych obserwowano grube, ogniskowo szkliwiejące włókna kolagenowe.

Po 26 tygodniach utworzone w tkankach podskórnych torebki łącznotkankowe były dobrze wykształcone i złożone z licznych włókien kolagenowych i fibrocytów. W tkankach znajdujących się w otoczeniu tkanek tłuszczowych nie stwierdzono zmian.

Po 52 tygodniach w otoczeniu wszczepów wyróżniono grube, dobrze wykształcone torebki łącznotkankowe z cechami szkliwienia włókien kolagenowych - RYS. 4. Poza toreb-

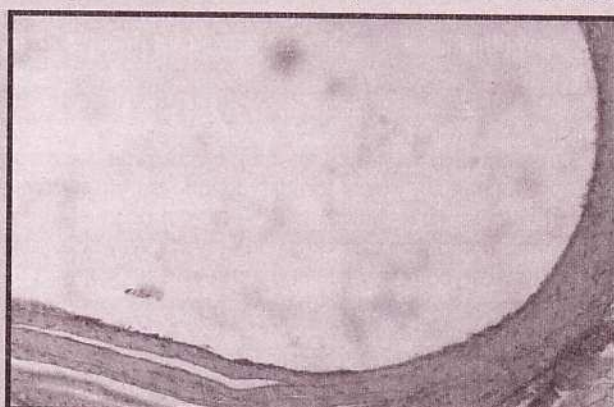
there developed a distinct connective tissue capsule containing numerous cells of mature fibrocyte character, with a few collagen fibres arranged longitudinally. No morphological changes were found in muscles surrounding the capsules.

After 26 weeks, in the vicinity of implants the medium-thick connective tissue capsules were found containing numerous collagen fibres and some fibrocytes. No morphological changes were found in muscles surrounding the capsules. After 52 weeks, thin and hyalinised connective tissue capsules were found around implants with no changes in the surrounding muscles - FIG. 2.

In the osseous tissue, after 12 weeks, thick connective tissue capsules developed, containing the longitudinally arranged collagen fibres and fibrocytes with large cell nuclei. Reconstruction traits were found in the spongy bone tissues.

After 26 weeks, in the vicinity of implants thick and irregular capsules were revealed, composed of multiple fibrocytes and a few collagen fibres. Mature osseous tissues were also found.

After 52 weeks, in the vicinity of implants, thin connective tissue capsules were found adhering closely to the reconstructed bones - FIG. 3. The capsules were built of few fibrocytes and delicate longitudinal collagen fibres. Thick osseous beams were revealed in the bone structures, containing rather numerous osteocytes and small oval inter-



**RYS. 4.** Tkanka podskórna. Gruba torebka łącznotkankowa z cechami szkliwienia włókien kolagenowych. Wszczep pokryty nanokrystalicznym diamentem po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

**FIG. 4.** Subcutaneous tissue. Thick connective tissue capsule with hyalinization collagen fibres features. Implant with the nanocrystalline diamond layer after 52 weeks of using (H&E, 100x).

beam spaces with numerous fine vessels.

In the experimental group, after 12 weeks, in the subcutaneous tissue, fatty connective tissue, rather thick connective tissue capsules developed around implants, built of a delicate connective tissue. The inner layer contained numerous fibroblasts and fibrocytes, and less numerous collagen fibres. In the outer layers, however, thick, focally hyalinising collagen fibres were observed.

After 26 weeks, the connective tissue capsules originated in the subcutaneous tissues were well developed and consisting of many collagen fibres and fibrocytes. No changes were found in tissues surrounding the fatty tissues.

After 52 weeks, well-developed thick connective tissue capsules were found in the vicinity of implants, with traits of hyalinising of the collagen fibres - FIG. 4. No changes were found apart from the capsules in the fatty tissues.

In muscles in turn, after 12 weeks, the implants were sur-

kami w tkankach tłuszczowych nie stwierdzono zmian morfologicznych.

W mięśniach z kolei po 12 tygodniach wszczepy były otoczone dobrze wykształconymi torebkami łącznotkankowymi. Zawierały liczne liniowo ułożone komórki typu dojrzałych fibrocytów z nielicznymi włóknami kolagenowymi o podłużnym przebiegu. Przylegająca do torebek tkanka mięśniowa nie wykazywała zmian.

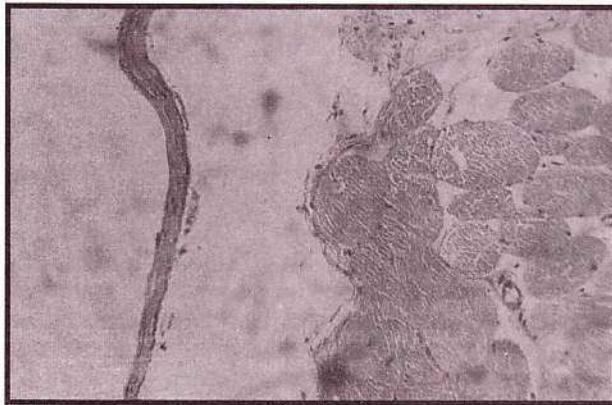
Po 26 tygodniach w utkaniu mięśni znaleziono w otoczeniu niezbyt grube torebki łącznotkankowe o strukturze licznych włókien kolagenowych i nielicznych fibrocytów. W tkankach przylegających do mięśni widoczne były przekroje drobnych naczyń krwionośnych. W mięśniach w otoczeniu torebek nie stwierdzono zmian.

Po 52 tygodniach wszczepy otaczały cienkie i zeszkliwione torebki łącznotkankowe. Utkanie przylegających mięśni nie wykazywało zmian - RYS. 5.

W kościach po 12 tygodniach w otoczeniach wszczepów wytworzyły się grube torebki łącznotkankowe, które zbudowane były z licznych włókien kolagenowych o podłużnym przebiegu oraz regularnie zlokalizowanych fibrocytów, charakteryzujących się wydłużonymi wrzecionowato jądrami komórkowymi. Sąsiadujące z torebkami tkanki kostne o budowie tkanki gąbczastej wykazywały cechy żywej odbudowy na co wskazywała obecność ułożonych sznurów komórek osteoblastycznych, wyściełających beleczki kostne od strony przestrzeni międzybeleckowych.

Po 26 tygodniach w otoczeniu wszczepów znajdowały się grube, nieregularne torebki łącznotkankowe złożone z bardzo licznych fibrocytów i mniej licznych włókien kolagenowych. Ogniskowo wchodziły w ich skład dojrzałe tkanki kostne pokryte cienkimi warstwami tkanki łącznej.

Po 52 tygodniach w tkance kostnej w otoczeniu wszczepów wytworzyły się grube torebki złożone od strony wewnętrznej z tkanek łącznych, włóknistych, a od zewnątrz z dojrzałych, uwapnionych tkanek kostnych. W warstwach łącznotkankowych obserwowano zgrupowanie licznych fibroblastów. Tu włókna kolagenowe były mniej liczne - RYS. 6.



**RYS. 5.** Mięsień. Cienka, zeszkliwiona torebka łącznotkankowa. Wszczep pokryty nanokrystalicznym diamentem po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

**FIG. 5.** Muscle. Thin, hyalinized connective tissue capsule. Implant with the nanocrystalline diamond layer after 52 weeks of using (H&E, 100x).

rounded by well-developed connective tissue capsules. They contained numerous linearly arranged cells of the mature fibrocyte type, with a few collagen fibres aligned longitudinally. The muscle tissue adhering to the capsules revealed no changes.

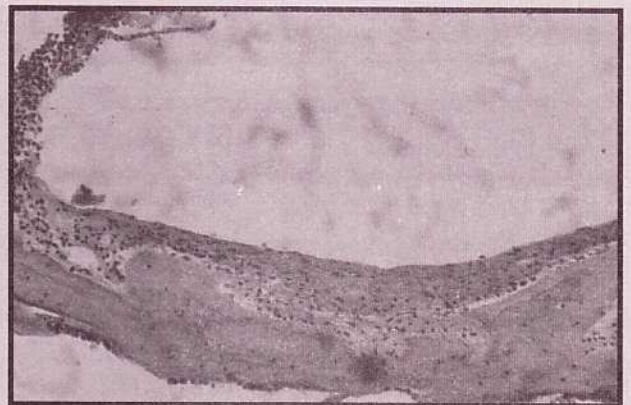
After 26 weeks, moderately thick connective tissue capsules were found in the muscle texture in the implant vicinity, with a structure of multiple collagen fibres and a few fibrocytes. Sections of fine blood vessels were visible in tissues adhering to muscles. No changes were found in muscles in the vicinity of capsules.

After 52 weeks, the implants were surrounded by thin and hyalinised connective tissue capsules. Texture of the adhering muscles revealed no changes - FIG. 5.

In bones, after 12 weeks, in the vicinity of implants, thick connective tissue capsules developed, built of numerous collagen fibres arranged longitudinally and regularly distributed fibrocytes, characterised by elongated fusiform cellular nuclei. The osseous tissues with spongy bone structure, neighbouring with the capsules, revealed traits of ongoing reconstruction, which was indicated by the presence of the arranged osteoblastic cell funicula, lining the bone beams from the inter-beam spaces side.

After 26 weeks, thick irregular connective tissue capsules were found in the vicinity of implants, consisting of abundant fibrocytes and a smaller amount of collagen fibres. They were composed of mature osseous tissues arranged focally, layered with thin connective tissue coatings.

After 52 weeks, thick irregular connective tissue capsules developed in the vicinity of implants, consisting of fibrous connective tissues on the inner side, and of the mature calcified osseous tissues on the outer side. Grouping of numerous fibroblasts was observed in the connective tissue layers. The collagen fibres were less numerous here - FIG. 6. No pathomorphological lesions were revealed in texture of internal organs, mostly liver and kidneys, of all examined animals. These organs had the correct texture, independent of the implant use period - FIGS. 7 and 8. The results of the pathomorphological examinations are given in tables.

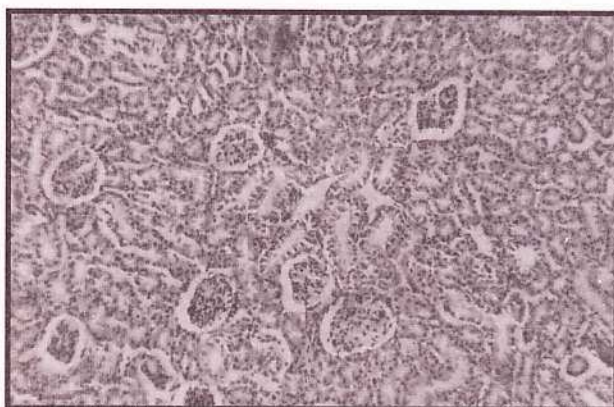


**RYS. 6.** Kość. Gruba torebka złożona częściowo z tkanki włóknistej oraz dojrzałej i uwapnionej tkanki kostnej. Wszczep pokryty nanokrystalicznym diamentem po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

**FIG. 6.** Bone. Thick capsule partly composed of the fibrous tissue as well as mature and calcified bone tissue. Implant with the nanocrystalline diamond after 52 weeks of using (H&E, 100x).

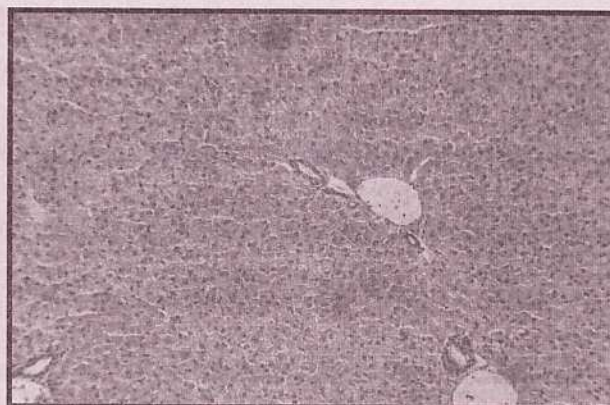
W utkaniu narządów wewnętrznych, głównie wątroby i nerek u wszystkich badanych zwierząt nie stwierdzono zmian patomorfologicznych. Narządy te miały prawidłowe utkanie niezależnie od czasu użytkowania wszczepu - RYS. 7 i 8. Wyniki badań patomorfologicznych zestawiono w tablicach.

The "-" mark denotes no observable qualitative changes. In turn "+" denotes observed qualitative changes of different intensity (from + to +++).



RYS. 7. Nerka. Obraz prawidłowy tkanek. Wszczep pokryty nanokrystalicznym diamentem po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

FIG. 7. Kidney. Tissue correct image. Implant with the nanocrystalline diamond after 52 weeks of using (H&E, 100x).



RYS. 8. Wątroba. Obraz prawidłowy tkanek. Wszczep pokryty nanokrystalicznym diamentem po 52 tygodniach użytkowania (H&E, 100x).

FIG. 8. Liver. Tissue correct image. Implant with the nanocrystalline diamond after 52 weeks of using (H&E, 100x).

Znak " - " oznacza brak zauważalnych zmian jakościowych. Z kolei " + " oznacza obserwowane zmiany jakościowe o zróżnicowanym nasileniu (od + do +++).

Zmiany w tkankach Changes in tissues	podskórnej subcutaneous			mięśniowej muscular			kostnej osseous		
	Okresy obserwacji [tygodnie] / Observation periods [weeks]								
	12	26	52	12	26	52	12	26	52
Torebka / Capsule	++	++	+++	++	++	+	+++	++	+++
Fibroblasty / Fibroblasts	++	-	-	+	-	-	-	-	++
Fibrocyty / Fibrocytes	++	++	+	+++	+	+	++	+++	++
Włókna kolagenowe / Collagen fibres	+	++	+++	+	++	+	+++	++	++
Szklwienie / Hyalinising	+	-	+++	-	-	+++	-	-	+
Metaplazja kostna / Cementification	-	-	-	-	-	-	+	++	+
<b>Otoczenie torebki Capsule surrounding</b>									
Tkanka tłuszczowa / Fatty tissue	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mięsień / Muscle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kość / Bone	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 2. Wyniki badań histopatologicznych tkanek świnek morskich po implantacji wszczepów ze stali AISI 316 L polerowanych elektrolitycznie i spasywowanych.

TABLE 2. Results of the histopathological examinations of guinea pigs tissues after inserting the AISI 316L steel implants, electrolytically polished and passivated.

Zmiany w tkankach Changes in tissues	podskórnej subcutaneous			mięśniowej muscular			kostnej osseous		
	Okresy obserwacji [tygodnie] / Observation periods [weeks]								
	12	26	52	12	26	52	12	26	52
Torebka / Capsule	++	++	+++	++	++	+	+++	++	+++
Fibroblasty / Fibroblasts	++	-	-	+	-	-	-	-	++
Fibrocyty / Fibrocytes	++	++	+	+++	+	+	++	+++	++
Włókna kolagenowe / Collagen fibres	+	++	+++	+	++	+	+++	++	++
Szklwienie / Hyalinising	+	-	+++	-	-	+++	-	-	+
Metaplazja kostna / Cementification	-	-	-	-	-	-	+	++	+
<b>Otoczenie torebki Capsule surrounding</b>									
Tkanka tłuszczowa / Fatty tissue	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mięsień / Muscle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kość / Bone	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA 3. Wyniki badań histopatologicznych tkanek świnek morskich po implantacji wszczepów ze stali AISI 316 L pokrytych warstwą pasywno - węglową.

TABLE 3. Results of the histopathological examinations of guinea pigs tissues after inserting the AISI 316L steel implants, coated with the passive-carbon layer.

Wprowadzenie implantu metalowego do środowiska tkanek jak wiadomo może spowodować oprócz zakażenia bakteryjnego także reakcje toksykologiczne i alergiczne [1,6]. W przeprowadzonym cyklu badań uwzględniającym zalecenia normy ASTM 981 - 86 [14] stwierdzono, że zabieg był wykonywany w warunkach sterylnych, gdyż nie obserwowano procesu zakażenia pooperacyjnego rany.

Badania radiologiczne wykonane po zakończeniu 12, 26 i 52 tygodniowej obserwacji nie wykazały również żadnych zmian odczynowych wokół wszczepów, a całkowita przebudowa kości w wykonywanych rynnach w kości piszczelowej nastąpiła po ok. 4 tygodniach.

W badaniach histopatologicznych zwierząt grupy kontrolnej proces gojenia w tkance podskórnej, mięśniach i kostnej zakończył się wytworzeniem wokół wszczepów torebki łącznotkankowej, zbudowanej z fibrocytów i włókien kolagenowych. W ścianach torebek nie obserwowano odczynu fagocytarnego ani obecności produktów korozji.

Narządy wewnętrzne tej grupy zwierząt nie wykazywały żadnych zmian, co wskazywało na dobry stan zdrowia użytych do doświadczeń świnek morskich. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do wątroby i nerek, gdyż narządy te biorą czynny udział w przemianie soli wapnia i potasu, decydujących o stanie układu kostnego. Badania biochemiczne i morfologiczne układu kostnego u chorych na wątrobę i nerki wykazały zmiany w kościach spowodowane przewagą procesów resorpcyjnych nad regeneracyjnymi [15, 16]. Całość obrazu patomorfologicznego wskazywała na bardzo dobrą biotolerancję wszczepionych biomateriałów metalicznych, a także ich odporność na korozję w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. Wykazana została także we wcześniejszych badaniach Marciniaka [11] i ocenach klinicznych innych autorów.

W odniesieniu do grupy zwierząt kontrolnych, którym wszczepiano krążki z dodatkowo naniesioną warstwą nanokrystalicznego węgla już po trzech miesiącach obserwacji stwierdzono wokół wszczepów torebkę łącznotkankową, której skład tkankowy zmieniał się stosownie do czasu trwania eksperymentu. Na ogół występowała tendencja do pogrubiania torebki, zwiększenia udziału fibrocytów kosztem fibroblastów, ciągły wzrost liczby włókien kolagenowych i wreszcie po 12 miesiącach pojawiły się cechy szklwienia torebki. Obserwowano wyraźne różnice grubości torebki w szczepach domięśniowych, w których ścienienie torebki mogło być spowodowane efektem drażnienia mięśnia grzbietowego, przyczyniając się do zakłócenia prawidłowego rozwoju torebki łącznotkankowej. W końcowym okresie obserwacji w torebkach łącznotkankowych pojawiła się metaplasja kostna zewnętrznej warstwy torebki, co prowadziło do pełnego zespolenia torebki z tkanką kostną.

Oceniając biotolerancję wszczepów ze stali AISI 316 L pokrytych warstwą pasywno - diamentową należy stwierdzić na podstawie wyników badań, że cechowały je bardzo dobre właściwości zaporowe, blokujące skutecznie przed rozwojem korozji i infiltracji jonów metalicznych do tkanek. U żadnego zwierzęcia nie stwierdzono produktów korozji w torebce i otaczających ją tkankach (w tkance tłuszczowej, mięśniowej i kostnej), w których nie ujawniono zauważalnych zmian strukturalnych, do których dochodzi w toku toksycznego oddziaływania na ustrój metali w wyniku rozwoju metalozy.

W podsumowaniu można stwierdzić, że wszczepy ze stali AISI 316 L uszlachetnione warstwą pasywną lub kompozytowo - diamentową cechuje bardzo dobra biotolerancja wykazana w eksperymencie wykonanym przez Zakład i Klinikę Patomorfologii Śląskiej Akademii Medycznej zgodnie z zaleceniami obowiązujących przepisów normatywnych wydanych przez Komitet Medycyny ASTM. Wpro-

## Discussion

As it is known, introducing a metallic implant into the tissue environment may cause, apart from the bacterial infection, also toxicological and allergic reactions [1, 6]. It was found out, in the cycle of experiments obeying the recommendations of the ASTM 981-86 standard [14], that the operation was carried out in the sterile conditions, as no postoperative infection process of the wound was noticed.

Radiological examinations after 12, 26, and 52 weeks from operation, did not reveal any reactions around the implants, and total bone reconstruction in the grooves made in the tibial bone occurred after about 4 weeks.

In the histopathological examination of animals from the control group, the healing process in the subcutaneous tissue, muscles, and osseous tissue ended up in developing the connective tissue capsule around the implants, built of fibrocytes and collagen fibres. Neither phagocytic reaction nor corrosion products were observed in the capsule walls.

The internal organs of animals from this group did not reveal any changes, which indicated good health of the guinea pigs used for the experiments. It is especially important in regard to the liver and kidneys, as these organs participate actively in the metabolism of calcium and potassium salts, deciding about the condition of the osseous system. Biochemical and morphological examinations of the osseous system of animals with liver and kidneys disease revealed changes in bones caused by the prevalence of resorption processes over the regeneration ones [15,16]. The overall patomorphological picture indicated very good biotolerance of the inserted metallic implants, and also their corrosion resistance in the environment of tissues and body fluids. The same was also stated in previous investigations by Marciniak [11] and clinical evaluations reported by other authors.

As regards the control group of animals, to which the discs with the additionally deposited nanocrystalline carbon coating were implanted, already after three months of observation the connective tissue capsule was revealed around the implants, the tissue composition changing with the duration of experiment. Generally, the capsule grew thicker, the fibrocyte portion increased at the cost of fibroblasts, the number of collagen fibres continuously increased, and, finally, after 12 months, the traits of capsule hyalinising appeared. Distinct differences in capsule thickness were observed in the intramuscular implants, in which thinning of the capsule might have been caused by irritation of the dorsum muscle, that disturbed correct development of connective tissue. At the final period of observation, cementification occurred in the outer capsule layer, which led to the complete union of the capsule with the osseous tissue.

Evaluating the biotolerance of implants from the AISI 316L steel coated with the passive-diamond layer, one has to state that they were characterised by very good barrier properties, blocking effectively corrosion and infiltration of metal ions into the tissues. Corrosion products were never revealed in the capsule and surrounding tissues (in the fatty, muscular, and osseous tissues) and no observable structural changes of these tissues were found, which might have occurred due to toxic effect of metals on the organism, i.e. development of metalosis.

In conclusion, one may state that implants from the AISI 316L steel, improved by the passive or composite passive-diamond coatings are characterised by very good biotolerance revealed in the experiment carried out in the Division and Chair of Pathomorphology of the Medical Academy in Zabrze, according to standard regulations issued by the Medical Committee of ASTM. The implants introduced into the tissue environment of the experimental animals did



wadzone do środowiska tkankowego zwierząt doświadczalnych implanty nie wywołały zmian patogenicznych w otaczających tkankach (podskórnej tkance tłuszczowej, mięśniowej i kostnej) oraz nie wywarły także wpływu toksycznego na narządy mięsiste (wątrobę, nerki, śledzionę i płuca). Zastosowana technika wytwarzania implantów ze stali AISI 316 L, uszlachetnionych warstwami pasywną lub pasywno-diamentową jest obiecująca i perspektywiczna dla chirurgii kostnej.

not develop any lesions in the surrounding tissues (in the subcutaneous fatty tissue, muscular, and osseous ones), and did not have any toxic effect on the parenchymal organs (liver, kidneys, spleen, and lungs). The technique of implant manufacturing from the AISI 316L steel improved with the passive or passive-diamond coating is promising for future application in the bone surgery.

## Piśmiennictwo

- [1] Ungenthün M., Winkler - Gniewek W.: Toxykologie der Metalle und Biokompatibilität metallischer Implantwerkstoffe. Z.Orthop., 122, (1984), 99-105.
- [2] Marciniak J.: Niektóre aspekty uszkodzeń korozyjnych płytek i wkretów kostnych implantowanych do kości. Arch. Techn. Bud. Maszyn PAN 8, (1990), 55-61.
- [3] Zitter H.: Schadensfälle an chirurgischen Implantaten und ihre Ursachen. Werkstoffe und Korros., 42, (1991), 455-466.
- [4] Marciniak J.: Perspectives of employning of the metallic biomaterials in the reconstruction surgery. Inżynieria Biomateriałów 1, (1997), 12- 19.
- [5] Marciniak J.: Biomateriały w chirurgii kostnej. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1992, 193 -210.
- [6] Marciniak J.: Biotolerancja implantów metalicznych w środowisku tkanek i płynów ustrojowych. II Symposium nt. "Inżynieria Ortopedyczna i Protetyczna - IOP, 99", Białystok, 213 - 219.
- [7] Niedzielski P., Mitura S., Paszenda Z., Marciniak J.: Diamond coated implants for medicine. 8th International Scientific Conference "Achievements in Mechanical and Materials Engineering", Rydzyna 1999, 569 -574.
- [8] Mitura S., Marciniak J., Niedzielski P., Paszenda Z.: Diamond coatings on implants for traumatology. International Conference of Biomaterials, Kraków 1999, Enginneering of Biomaterials 7 - 8, (1999), 65 - 72.

## References

- [9] Marciniak J., Boba J., Paszenda Z., Mitura S.: Einfluß von Passivierungs- und Kohlenstoffschichten auf austenitischen CrNiMo - Stählen auf die Beständigkeit gegen Lochfraß und Spannungrißkorrosion. Werkstoffe und Korros. 44, (1992), 379 - 383.
- [10] Patent P 314 703.
- [11] Marciniak J. i współ.: Biomechaniczne, metaboliczne i biomechaniczne aspekty złamań. Praca badawcza Instytutu Metaloznawstwa Politechniki Śląskiej NB-207/RMT-286-90, Gliwice 1986. Praca badawcza Instytutu Metaloznawstwa Politechniki Śląskiej NB - 206/RMT-2/86.
- [12] Koczy B.: Badania nad własnym modelem oceny biotolerancji stopów metalicznych stosowanych w chirurgii kostnej. Praca doktorska Śląskiej Akademii Medycznej 1986.
- [13] Szczurek Z., Koczy B., Myrcik H., Marciniak J.: Ocena biotolerancji implantatów ze stali Cr-Ni-Mo. Ogólnopolska Konferencja Biomechaniki. Gdańsk 1987, 537 - 541.
- [14] Norma ASTM 981 - 86.
- [15] Gburek Z., Szczurek Z., Sośnierz M., Ciołkorz I.: Badania biochemiczne i oligo- biopsyjne kości w marskości wątroby. Wiad. Lek., 29, (1976), 2115 - 2119.
- [16] Gburek Z., Szczurek Z., Sośnierz M., Ciołkorz I.: Badania biochemiczne i oligobiopsyjne kości w przewlekłym odmiedniczkowym zapaleniu nerek. Wiad. Lek. 28. (1976), 1715 - 1719.