

ODPOWIEDŹ TKANEK MIĘKKICH NA POROWATE I LITE IMPLANTY PGLA

ELŻBIETA MENASZEK*, BOŻENA OGRODNA*, MARIA ŻOŁNIEREK*, ELŻBIETA PAMUŁA**

*UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM, ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII, UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW, POLSKA.

**AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIALOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

Streszczenie

Resorbowalny kopolimer glikolidu i L-laktydu, otrzymany metodą odlewania z roztworu i wypłukiwania soli, przygotowano w dwóch postaciach: folii i gąbki. Otrzymane materiały były wszczepiane do mięśnia szkieletowego szczurów na okres 7, 30 i 90 dni w celu zbadania odpowiedzi immunologicznej tkanek miękkich, w zależności od właściwości zastosowanego materiału. W przypadku materiału porowatego stan zapalny wokół implantu trwał dłużej i miał zdecydowanie większe nasilenie. Zastosowane materiały PGLA różnią się też przebiegiem procesu degradacji w tkance.

[Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 212-217]

Wstęp

Biodegradowalne podłoża polimerowe konstruowane są w celu uzyskania materiału będącego nośnikiem do hodowli izolowanych komórek, umożliwiającego formowanie nowych, trójwymiarowych tkanek. W związku z procedurą uzyskania hodowli komórkowej i jej późniejszej implantacji do funkcjonujących tkanek, materiał na podłoża tkankowe musi posiadać cechy konieczne dla hodowli komórek zarówno w warunkach in vitro, jak i in vivo.

Resorbowalny kopolimer glikolidu i L-laktydu (PGLA), przebadany uprzednio in vitro [1], przeznaczony do wypełniania ubytków kostnych, wszczepiano do tkanki mięśniowej. Jako model do badań wybrano mięsień szkieletowy szczura ze względu na to, że materiał zastępujący kość będzie w kontakcie nie tylko z tkanką kostną, ale także z otaczającymi ją tkankami miękkimi, których odpowiedź immunologiczna jest ostrzejsza niż w przypadku tkanki kostnej [2].

Wszczepienie biomateriału wywołuje odpowiedź immunologiczną gospodarza. Początkowo jest to odpowiedź nieswoista, wywołana samym zabiegiem chirurgicznym. W następnym etapie staje się odpowiedzią na wszczepione ciało obce. W niniejszej pracy badano biologiczny efekt materiałów PGLA wszczepionych w dwóch postaciach: jeden w formie litej folii i drugi w formie porowatej gąbki. Wiadomo, że oprócz innych właściwości implantu, na nasilenie odpowiedzi tkankowej mogą wpływać cechy jego powierzchni, w tym jej rozmiar [3]. Przy tej samej masie zastosowane materiały różnią się znacznie wielkością powierzchni, co ma odbicie w reakcji tkanek na obydwa implanty.

Metody

Materiały

Kopolimer glikolidu z L-laktydem (18:82 stosunek molo-

THE SOFT-TISSUE RESPONSE TO POROUS AND SOLID IMPLANTS OF PGLA

ELŻBIETA MENASZEK*, BOŻENA OGRODNA*, MARIA ŻOŁNIEREK*, ELŻBIETA PAMUŁA**

*JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY, 9 MEDYCZNA ST., 30-068 CRACOW, POLAND

**AGH-UTS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, 30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 CRACOW, POLAND

Abstract

Resorbable copolymer of glycolide and L-lactide was processed in forms of foils and foams, obtained by solvent casting / particulate leaching method. The resulting two forms of copolymer were implanted into skeletal muscle of rats for 7, 30 and 90 days to examine the soft-tissue response according to the different properties of the obtained materials. The implanted porous material elicited a much more severe immunological response than the foil. The degradation of the two materials proceeded differently as well.

[Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 212-217]

Introduction

Biodegradable polymer scaffolds are prepared as a supporting material for isolated cells to grow and form three-dimensional new tissues. According to the procedure of obtaining a culture of seeded cells and its later implantation into the functioning tissue, the material for the scaffold must be suitable both for in vitro and in vivo tissue culture.

The resorbable copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) examined previously under in vitro conditions [1], designed for bone rebuilding, has been implanted into muscle tissue. The rat skeletal muscle model has been chosen due to two important factors: the bone-replacing material will be in contact not only with bone, but also with the surrounding soft tissues; and these tissues' immunological response is more severe than in bone [2].

The implantation of a biomaterial induces a host inflammatory response. At first, it is due to the surgical injury of the tissues; afterwards, it is a reaction to the implanted foreign body. In the current study we examine the biological effects of two PGLA materials applied in two forms: one in the form of solid foil, and the second in the form of porous foam. It is stated that the extent of cellular response to the implant can be influenced by the surface characteristics of the biomaterial and among them, its area [3]. Although the two forms have the same mass, their areas greatly differ what has a reflection in the tissue response to these materials.

Methods

Materials

Copolymer of glycolide and L-lactide (18:82 glycolide to L-lactide molar ratio; molecular masses: Mn= 34kDa, Mw=85 kDa) was synthesized in the Centre of Polymer Chemistry,

wy glikolidu do L-laktydu, masy cząsteczkowe $M_n = 34$ kDa, $M_w = 85$ kDa) zsyntezowano w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu, zgodnie z metodą opisaną poprzednio [4]. Folie polimerowe otrzymano poprzez odlanie na szklane szalki Petriego 10% (m/v) roztworu kopolimeru w chlorku metylenu. Gąbki otrzymano stosując metodę odlewania z roztworu i wypłukiwania soli zgodnie z metodą opisaną poprzednio [5]. Cytrynian sodu (POCH, Gliwice) o zdefiniowanej wielkości (500±100 μm), zmieszano z 10% (m/v), odlano na szalki Petriego, wysuszone na powietrzu i w suszarce próżniowej. Następnie próbki płukano w wodzie destylowanej w celu usunięcia soli, suszono w suszarce próżniowej przez co najmniej 24 h i przechowywano w eksykatorze.

Grubość folii polimerowych wynosiła: $0.18 \text{ mm} \pm 0.014 \text{ mm}$, a grubość gąbek wynosiła $1.68 \text{ mm} \pm 0.11 \text{ mm}$. Porowatość otrzymanych gąbek wynosiła $87.0 \pm 1.4\%$, a wielkość porów była zbliżona do wielkości cząstek porogenu, tj. $600 \pm 100 \mu\text{m}$ [5].

Przed implantacją próbki zostały wysterylizowane metodą plazmy nadładowania wodoru (Sterrad 120, ASP, Johnson & Johnson).

Zwierzęta

Użyte w eksperymencie dorosłe szczury rasy kapturowej pochodziły z hodowli własnej Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Zwierzęta przetrzymywane były w zwierzętarni w warunkach standardowych, ze swobodnym dostępem do paszy i wody.

Implantacja

Materiał PGLA w postaci folii lub gąbki o masie 0.02 g wszczepiano do naciętego mięśnia pośladkowego szczura. Każde ze zwierząt otrzymało dwa implanty: do prawego mięśnia folię i do lewego gąbkę PGLA. Zabieg przeprowadzono w warunkach aseptycznych i pod narkozą.

Badania histologiczne i histochemiczne

Po upływie 7, 30 i 90 dni od operacji, po 5 zwierząt z każdej serii zabijano w celu uzyskania wycinka tkankowego wraz z biomateriałem. Pobraną tkankę zamrażano w ciekłym azocie i skrawano przy użyciu mikrotomu kriostatowego. Na uzyskanych skrawkach przeprowadzono barwienie histologiczne metodą May-Grünwalda Giemsa (MGG) [6] w celu identyfikacji komórek stanu zapalnego oraz histochemiczne pozwalające ocenić nasilenie stanu zapalnego oraz aktywność metaboliczną tkanek otaczających implant. Badano aktywność następujących enzymów: fosfatazy kwasnej (FK) [7], esterazy niespecyficznego (EN) [8] oraz oksydazy cytochromu c (OCC), dehydrogenazy NADH (NADHDH), dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i glukozy-6-fosforanowej (G6PDH) [9].

Relatywna liczba komórek stanu zapalnego (makrofagów, neutrofilów, eozynofili, mastocytów i wielojądrowych komórek olbrzymich) i aktywność FK i EN służyła jako kryterium nasilenia stanu zapalnego w 5-stopniowej skali szacunkowej: brak reakcji (Stopień 0), minimalny (Stopień 1), słaby (Stopień 2), średni (Stopień 3), silny (Stopień 4) i bardzo silny odczyn reakcji (Stopień 5). Takiej samej skali użyto do oceny enzymatycznej aktywności komórek stanu zapalnego oraz włókien mięśniowych otaczających implant.

Wyniki i dyskusja

W serii 7-dniowej implanty obu typów nie wykazywały cech degradacji. PGLA gąbka otoczona było naciekiem zapalnym, składającym się głównie z neutrofilów oraz z makrofagów. Wysoki udział neutrofilów w nacieku zapalnym

Polish Academy of Sciences, Zabrze, according to a method described previously [4].

The foils were obtained by solvent casting of 10% [w/v] copolymer solution in methylene chloride on glass Petri dishes, followed by air and vacuum drying.

The foams were produced through a solvent casting / particulate leaching technique, according to a method described elsewhere [5]. Briefly, sieved sodium citrate particles (POCH, Gliwice, Poland) of defined size ($500 \pm 100 \mu\text{m}$), were mixed with 10% (w/v) copolymer solution in methylene chloride, and followed by air and vacuum drying. Next, salt was leached in distilled water and the resulting samples dried in the oven under decreased pressure for at least 24h and stored in a desiccator prior to use.

The thickness of the foils and foams was $0.18 \text{ mm} \pm 0.014 \text{ mm}$ and $1.68 \text{ mm} \pm 0.11 \text{ mm}$, respectively. The porosity of the foams was $87 \pm 1.4\%$ and the pore size was $600 \pm 100 \mu\text{m}$, e.g. close to the size of porogen particles [5].

Before implantation, the foils and foams were sterilized using the plasma-hydrogen peroxide method (Sterrad 120, ASP, Johnson & Johnson).

Animals

Adult hooded rats used in the experiment were derived from the Animal Facility of the Jagiellonian University Pharmaceutical Faculty. Animals were maintained under standard conditions with free access to food and water.

Implantation

PGLA material in the form of foil or foam weighing 0.02 g was inserted into the glutei muscles of the rats. Each animal received two implants: the foil into the right muscle, and the foam into the left one. All procedures were conducted in sterile conditions and under anaesthesia.

Histological and histochemical analysis

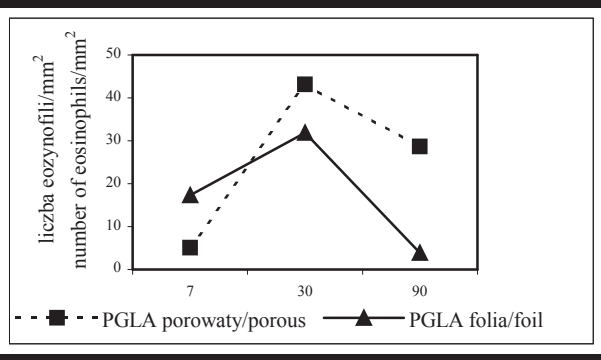
At 7, 30 and 90 days after implant surgery, animals were sacrificed and tissue blocks containing the biomaterial were excised. Samples were frozen in liquid nitrogen and cut into 6mm thick slides in a cryostat microtome.

On the obtained slides histological reactions were carried out by May-Grünwald Giemsa (MGG) method to identify inflammatory cells [6], and histochemical reactions to estimate the intensity of inflammation and the metabolic activity of muscle tissue surrounding implants. The activity of following enzymes was studied: acid phosphatase (FK) [7], non-specific esterase (EN) [8], and cytochrome c oxidase (OCC), NADH dehydrogenase (NADHDH), lactic dehydrogenase, and glucoso-6-phosphorase dehydrogenase (G6PDH) [9].

The relative numbers of inflammatory cells (macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells and multinucleated giant cells) as well as FK and EN activity were used as criteria of inflammation severity on a 5-point ordinal severity scale: no reaction (Grade 0), minimal (Grade 1), mild (Grade 2), moderate (Grade 3), strong (Grade 4), and very strong reaction (Grade 5). The same scale was used to estimate the enzymatic activity of the inflammatory cells and muscle fibres surrounding the implants.

Results and discussion

7-day series. Neither implant (foam or foil) exhibited signs of degradation. The PGLA foams were surrounded by inflammatory infiltration cells, consisting mainly of neutrophils and macrophages. The presence of numerous neutrophils in this inflammatory infiltration is characteristic of an acute prolonged acute inflammation [10]. In addition, early devel-



RYS. 1. Średnia liczba eozynofili w tkankach otaczających implanty PGLA.

FIG. 1. The average number of eosinophils in tissues surrounding PGLA implants.

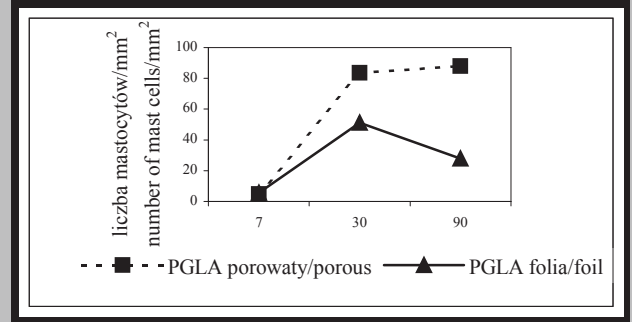
świadczy o przedłużonej ostrej fazie zapalenia [10]. Obserwowano początkowe stadia tworzenia się komórek wielojądrowych. W tym samym czasie wokół wszczepionego PGLA folii powstawała już tkanka ziarninowa: wśród komórek nacieku zapalnego nie obserwowano już neutrofilii charakterystycznych dla wczesnego stadium odpowiedzi immunologicznej, oprócz makrofagów wokół implantu pojawiło się więcej fibroblastów.

W serii 30-dniowej tylko brzeżne części materiału porowatego uległy fragmentacji, na powierzchni folii natomiast widoczne były liczne pęknięcia. Wzrosła liczba napływających mastocytów i eozynofili (RYS. 1, 2). Na powierzchni implantów pojawiły się komórki olbrzymie, szczególnie liczne w przypadku materiału porowatego.

W serii 90-dniowej nastąpiła degradacja PGLA folii. Sposób degradacji wskazuje jednak na autokatalityczny mechanizm degradacji [5, 11]. Jednocześnie stan zapalny wokół folii wygasł: obniżyła się liczba mastocytów, eozynofili i makrofagów, w stosunku do krótkich serii niższa była aktywność enzymów hydrolitycznych FK i EN. Stan zapalny wokół PGLA gąbki natomiast był wciąż intensywny: licznie występowały komórki wielojądrowe świadczące o toczących się procesach degradacji i fagocytozy, ale również o przewlekłym stanie zapalnym [12], wysokie było nasilenie reakcji na aktywność enzymów FK i EN (RYS. 3).

W celu oceny wpływu implantów na kondycję metaboliczną otaczających tkanek, badano aktywność enzymów o szczególnym znaczeniu dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych: dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, dehydrogenazy NADH, dehydrogenazy mleczanowej oraz oksydazy cytochromu c (TAB. 1-4). Porównując aktywność badanych enzymów w włóknach mięśniowych leżących przy wszczepie i oddalonych od wszczepów stwierdzono, że włókna przy wszczepach mają aktywności zbliżone lub wyższe od włókien oddalonych od implantów. Implantacja PGLA folii i PGLA gąbki nie tylko nie wpłynęła więc ujemnie na stan włókien mięśniowych, ale spowodowała mobilizację procesów metabolicznych w komórkach otaczających wszczep.

Poziom aktywności G6PDH w włóknach mięśniowych regenerujących przy obu rodzajach implantów w serii 7-dniowej był wyższy niż w włóknach dojrzałych. Wyższa aktywność tego enzymu związana jest z nasilonymi procesami syntezy składników komórkowych w procesach regeneracji. Również w seriach 30 i 90-dniowych, w peryferyjnych strefach ziarniny obserwowano regenerujące włókna mięśniowe o wysokiej aktywności badanych enzymów utleniających.



RYS. 2. Średnia liczba mastocytów w tkankach otaczających implanty PGLA.

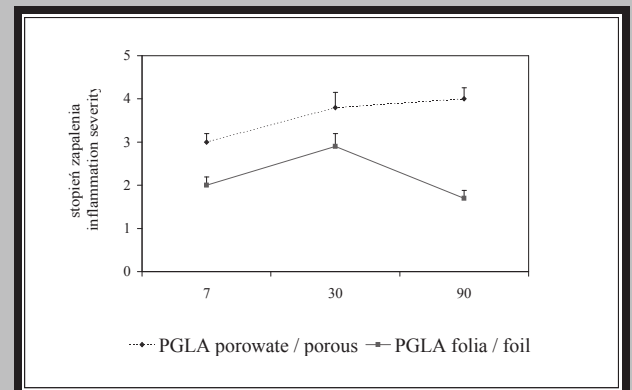
FIG. 2. The average number of mast cells in tissues surrounding PGLA implants.

opmental stages of multinucleated giant cells were observed. Meanwhile, granulation tissue around the PGLA foil started to form where inflammatory cells were less abundant. Neutrophils characteristic of acute inflammation were not observed, and additional fibroblasts appeared close to the implant.

30-day series. Whereas only partial fragmentation on the periphery of the foam implant occurred, the foil implant had numerous splits visible on its surface. Multinucleated foreign body giant cells developed on the surface of both implants, but they were particularly abundant on the foam. The number of infiltrating eosinophils and mast cells significantly increased (FIG. 1, 2).

90-day series. Foil degradation occurred in a manner indicative of the autocatalytic mechanism [5, 11]. Inflammation around the foil started to disappear; the number of eosinophils, mast cells and macrophages decreased compared to the previous series; and the hydrolytic activity of FK and EN enzymes in granulation tissue cells was markedly lower. Inflammation around the foam implant, though, was still strong; numerous multinucleated giant cells showed phagocytosis and degradation as well as chronic inflammation [12]; the activity of FK and EN was high (FIG. 3).

In order to estimate the effect of the implants on the metabolic state of the surrounding tissues, the activities of the marker metabolic enzymes were examined: glucoso-6-phosphatase dehydrogenase, NADH dehydrogenase, lactic dehydrogenase, and oxidase of cytochrome c (TAB. 1-4). The enzymatic activities in muscle fibres in close proximity to the implants were compared to those further away. It was



RYS. 3. Nasilenie stanu zapalnego w tkankach wokół implantów PGLA.

FIG. 3. Severity of the tissue inflammatory response to PGLA implants.

| składowe tkanek tissue elements | | PGLA gąbka / foam | | | | | | PGLA folia / foil | | | | | |
|--|------------------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | |
| | | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD |
| wł.m. dalekie* distant m.fibres | szerokie wide | 2,38 | 0,32 | 1,25 | 0,20 | 2,06 | 0,12 | 2,63 | 0,12 | 1,75 | 0,20 | 2,0 | 0,20 |
| | wąskie narrow | 2,88 | 0,32 | 2,25 | 0,29 | 2,88 | 0,14 | 3,19 | 0,24 | 2,06 | 0,43 | 2,94 | 0,24 |
| wł.m. bliskie** close m.fibres | szerokie wide | 2,63 | 0,52 | 1,56 | 0,43 | 2,56 | 0,43 | 2,69 | 0,24 | 2,19 | 0,55 | 2,63 | 0,32 |
| | wąskie narrow | 3,25 | 0,20 | 2,69 | 0,43 | 3,56 | 0,24 | 2,69 | 0,24 | 2,0 | 0,88 | 3,38 | 0,32 |
| wł. regenerujące regenerative m.fibres | | 3,75 | 0,20 | 2,38 | 0,85 | 3,63 | 0,32 | 3,5 | 0,12 | 3,13 | 0,32 | 3,13 | 0,32 |
| Fibroblasty fibroblasts | | - | - | 3,38 | 0,32 | 3,88 | 0,48 | 3,5 | 0,20 | 3,63 | 0,32 | 2,75 | 0,20 |
| ściana naczyń vessels' wall | | 3,56 | 0,12 | 3,5 | 0,41 | 4,25 | 0,20 | 3,25 | 0,32 | 3,19 | 0,55 | 3,81 | 0,24 |
| kom. olbrzymie giant cells | | - | - | 4,63 | 0,32 | 4,38 | 0,32 | - | - | 4,69 | 0,24 | - | - |
| ziarnina ogółem granulation tissue in all | | 3,38 | 0,32 | 3,75 | 0,20 | 4,38 | 0,43 | 3,25 | 0,20 | 4,13 | 0,14 | 3,25 | 0,20 |

TABELA. 1. Aktywność enzymu G6PDH w tkankach wokół implantów PGLA.

TABLE 1. The activity of G6PDH in tissues surrounding PGLA implants.

x włókna mięśniowe oddalone od wszczepu / muscle fibres distant from the implant
xx włókna mięśniowe położone przy wszczepie / muscle fibres close to the implant

| składowe tkanek tissue elements | | PGLA gąbka / foam | | | | | | PGLA folia / foil | | | | | |
|--|------------------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | |
| | | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD |
| wł.m. dalekie distant m.fibres | szerokie wide | 2,44 | 0,31 | 3,19 | 0,55 | 3,25 | 0,20 | 2,63 | 0,14 | 3,50 | 0,20 | 3,13 | 0,14 |
| | wąskie narrow | 3,00 | 0,46 | 3,44 | 0,55 | 3,63 | 0,14 | 3,25 | 0,20 | 3,75 | 0,20 | 3,50 | 0,20 |
| wł.m. bliskie close m.fibres | szerokie wide | 2,63 | 0,52 | 2,81 | 0,43 | 3,63 | 0,14 | 2,13 | 0,14 | 3,63 | 0,14 | 3,19 | 0,12 |
| | wąskie narrow | 3,25 | 0,46 | 3,19 | 0,43 | 3,75 | 0 | 2,63 | 0,14 | 3,69 | 0,12 | 3,38 | 0,14 |
| wł. regenerujące regenerative m.fibres | | 3,88 | 0,14 | 3,31 | 0,24 | 3,88 | 0,14 | 3,5 | 0,20 | 3,50 | 0,20 | 3,50 | 0,20 |
| Fibroblasty fibroblasts | | - | - | 3,56 | 0,24 | 4,25 | 0,20 | 3,5 | 0,20 | 3,81 | 0,24 | 3,75 | 0,20 |
| ściana naczyń wall of vessels | | 3,63 | 0,14 | 2,88 | 0,32 | 3,50 | 0,20 | 3,25 | 0,32 | 3,31 | 0,55 | 3,19 | 0,24 |
| kom. olbrzymie giant cells | | - | - | 3,88 | 0,32 | 4,31 | 0,24 | - | - | 3,75 | 0,25 | 3,63 | 0,18 |
| ziarnina ogółem granulation tissue in all | | 3,25 | 0,29 | 3,56 | 0,24 | 3,99 | 0,20 | 3,25 | 0,14 | 3,63 | 0,3 | 3,50 | 0,20 |

TABELA. 2. Aktywność enzymu LDH w tkankach wokół implantów PGLA.

TABLE. 2. The activity of LDH in tissues surrounding PGLA implants.

Porównując nasilenie reakcji na aktywność enzymów G6PDH, NADHDH i OCC w ziarninie otaczającej wszczep 90-dniowe folii i gąbek stwierdzono, że było ono słabsze dla litych implantów. Wyniki te wskazują, że okres intensywnej naprawy tkanek zakończył się szybciej w przypadku PGLA folii, natomiast wokół PGLA gąbki trwał nadal, 90 dni po zabiegu. Osłabienie aktywności enzymatycznej ziarniny przy PGLA folii w serii 90-dniowej może być również związane z uwalnianiem kwaśnych produktów rozkładu z folii degradującej intensywniej, niż PGLA o porowatej strukturze. Wydają się to potwierdzać obserwacje aktywności LDH. Jest to jedyny z badanych enzymów, który w 90-dniowej serii nie wykazał spadku aktywności w tkance naprawczej wokół folii w stosunku do serii 30-dniowej. Przyczyną może być uwalnianie kwasu mlekowego - produktu degradacji PGLA i zarazem substratu dla tego enzymu. Dane

observed that fibres neighbouring the implant had activity similar to or higher than the more distant ones.

In conclusion, the PGLA implants (foam and foil) did not seem to have any detrimental physiologic effect on the surrounding muscle fibres. Instead, they generated the mobilization of metabolic processes in those fibres. The level of G6PDH activity in regenerating muscle fibres in the 7-day series of both implants was higher than in already-differentiated fibres. Such high enzymatic activity indicates an increased level of cellular metabolic processes during regeneration. Similarly, in the 30- and 90-day series, a higher level of the oxidative enzymes activity was detected in the regenerating muscle fibres within granulation tissue. Evaluation of the oxidative enzymes' activity levels (G6PDH, NADHDH, and OCC) in the granulation tissue surrounding implants in the 90-day series, showed a lower activity level

| składowe tkanek tissue elements | | PGLA gąbka / foam | | | | | | PGLA folia / foil | | | | | |
|--|------------------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | |
| | | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD |
| wł.m. dalekie distant m.fibres | szerokie wide | 2,88 | 0,14 | 2,19 | 0,24 | 2,50 | 0,58 | 2,88 | 0,14 | 2,38 | 0,32 | 2,75 | 0,29 |
| | wąskie narrow | 3,63 | 0,14 | 3,25 | 0,20 | 3,50 | 0,20 | 3,81 | 0,12 | 2,81 | 0,55 | 3,63 | 0,32 |
| wł.m. bliskie close m.fibres | szerokie wide | 2,88 | 0,14 | 2,06 | 0,32 | 2,63 | 0,32 | 3,00 | 0,20 | 2,5 | 0,20 | 3,00 | 0,29 |
| | wąskie narrow | 3,50 | 0,29 | 3,25 | 0,29 | 3,50 | 0,20 | 3,38 | 0,32 | 2,88 | 0,32 | 3,88 | 0,14 |
| wł. regenerujące regenerative m.fibres | | 3,50 | 0,14 | 3,63 | 0,14 | 3,56 | 0,43 | 3,5 | 0,14 | 3,13 | 0,32 | 3,31 | 0,24 |
| Fibroblasty fibroblasts | | - | - | 4,00 | 0,20 | 3,88 | 0,14 | 3,75 | 0,32 | 4,31 | 0,20 | 3,56 | 0,31 |
| ściana naczyń wall of vessels | | 3,69 | 0,12 | 3,88 | 0,14 | 4,25 | 0,20 | 3,5 | 0,14 | 4,31 | 0,24 | 4,13 | 0,14 |
| kom. olbrzymie giant cells | | - | - | 4,69 | 0,12 | 4,63 | 0,14 | - | - | 4,43 | 0,14 | 4,00 | 0,20 |
| ziarnina ogółem granulation tissue in all | | 3,00 | 0,41 | 4,25 | 0,20 | 4,38 | 0,14 | 3,5 | 0,32 | 4,56 | 0,31 | 3,50 | 0,20 |

TABELA 3. Aktywność enzymu NADHDH w tkankach wokół implantów PGLA.
TABLE 3. The activity of NADHDH in tissues surrounding PGLA implants.

| składowe tkanek tissue elements | | PGLA gąbka / foam | | | | | | PGLA folia / foil | | | | | |
|--|------------------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|-------------------|------|----------------|------|----------------|------|
| | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | | 7 dni/days | | 30 dni/days | | 90 dni/days | |
| | | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD |
| wł.m. dalekie distant m.fibres | szerokie wide | 3,38 | 0,32 | 2,88 | 0,32 | 3,31 | 0,55 | 3,50 | 0,40 | 3,00 | 0,20 | 3,31 | 0,24 |
| | wąskie narrow | 4,13 | 0,14 | 3,56 | 0,12 | 3,81 | 0,55 | 4,19 | 0,23 | 3,75 | 0,20 | 3,94 | 0,24 |
| wł.m. bliskie | szerokie wide | 3,25 | 0,20 | 2,94 | 0,42 | 3,25 | 0,29 | 3,63 | 0,14 | 3,38 | 0,32 | 3,56 | 0,43 |
| | wąskie narrow | 3,63 | 0,14 | 3,75 | 0,20 | 3,94 | 0,43 | 4,00 | 0,20 | 3,75 | 0,20 | 3,94 | 0,43 |
| wł. regenerujące regenerative m.fibres | | 4,31 | 0,23 | 3,63 | 0,14 | 4,00 | 0,20 | 4,0 | 0,32 | 3,63 | 0,14 | 4,00 | 0,20 |
| Fibroblasty fibroblasts | | - | - | 3,38 | 0,14 | 2,50 | 0,20 | 3,5 | 0,54 | 3,88 | 0,32 | 3,06 | 0,24 |
| ściana naczyń wall of vessels | | 3,25 | 0,20 | 2,13 | 0,32 | 2,81 | 0,75 | 2,0 | 0,54 | 2,50 | 0,35 | 2,75 | 0,35 |
| kom. olbrzymie giant cells | | - | - | 4,38 | 0,14 | 4,56 | 0,31 | - | - | 4,75 | 0,23 | 4,25 | 0,25 |
| ziarnina ogółem granulation tissue in all | | 3,75 | 0,20 | 3,69 | 0,23 | 3,88 | 0,14 | 4,0 | 0,20 | 3,88 | 0,32 | 3,25 | 0,20 |

TABELA 4. Aktywność enzymu OCC w tkankach wokół implantów PGLA.
TABLE 4. The activity of OCC in tissues surrounding PGLA implants.

literaturowe wskazują na możliwość wpływu produktów rozpadu PGLA na odpowiedź tkankową [13, 14].

W przedstawionym doświadczeniu na silniejsze działanie enzymatyczne narażone były gąbki, indukujące stan zapalny z większym napływem fagocytów i powstawaniem licznych wielojądrowych komórek olbrzymich. Nie spowodowało to jednak znacznego przyspieszenia degradacji porowatych struktur polimerowych. Prawdopodobnie hydrofobowy charakter polimeru utrudnia zarówno powierzchnię hydrolizę, jak i działanie enzymów, które mają hydrofilowe właściwości [15].

Podziękowania

Autorki dziękują Panu Dr P. Dobrzyńskiemu i Panu Doc. M. Bero (Centrum Chemii Polimerów, Zabrze) za dostarczenie próbek kopolimerów.

around the foils. These results indicate that the period of intensive tissue regeneration ended faster near the foil implants, whereas around the foam implants such regeneration was still occurring 90 days into the experiment. This attenuation in enzymatic activities around the foil can likely be attributed to the release of acidic products by the more rapidly degrading foil compared to the more slowly degrading, porous PGLA.

The above findings were confirmed by measuring the activity of lactate dehydrogenase as well. LDH was the only enzyme in the 90-day series with an activity which did not decrease in the regenerating tissue around the implant compared to the 30-day series. The reason for this may be the release of lactic acid, which is both a PGLA degradation product as well as the substrate for LDH. Some reports in the literature suggest that PGLA degradation products do affect the tissue response [13, 14].

In our experiments the foam material was more susceptible

Praca była finansowana z projektu badawczego KBN 'Nowe materiały i technologie dla inżynierii biomedycznej' (PBZ-KBN-082/T08/2002).

to elevated enzymatic activity, leading to stronger inflammatory responses with macrophage in-flow and the appearance of numerous giant cells. This response, however, did not accelerate the degradation rate of the porous polymeric structures. Probably the hydrophobic nature of these polymers hinders both surface hydrolysis as well as the activities of enzymes with hydrophilic mechanisms of catalysis [15].

Piśmiennictwo

- [1] Pamuła E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., "Bioresorbowalne podłoża dla inżynierii tkankowej z kopolimeru glikolidu z L-laktydem: wpływ mikrostruktury na osteoblasty in vitro", *Inżynieria Biomateriałów* 30 (2003): 95-99.
- [2] Ooms E.M., Egglezos E.A., Wolke J.G.C., Jansen J.A., "Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements", *Biomaterials* 24 (2003): 749-757.
- [3] Chesmel K.D., Black J., "Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel in vitro model system", *J Biomed Mater Res* 29 (1995): 1089-1099.
- [4] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Janeczek H., Bero M., "Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerisation of glycolide with L-lactide initiated by $Zr(acac)_4$ ", *Macromolecules* 34 (2001), 5090-5098.
- [5] Pamuła E., Buczyńska J., Menaszek E., Dobrzyński P., "How microstructural factors influence in vitro and in vivo degradation of poly(glycolide-co-L-lactide)", *Engineering of Biomaterials* (2004), in print
- [6] Zawistowski S., "Technika histologiczna, histologia i podstawy histopatologii", PZWL (1986), str. 145.
- [7] Goldberg A.F., Barka T., "Acid phosphatase activity in human blood cells", *Nature* 195 (1962): 297.

Acknowledgements

The authors thank Dr P. Dobrzyński and Doc M. Bero (Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences, Zabrze) for providing the copolymer samples.

The research program of the Polish Committee for Scientific Research "New materials and technologies for biomedical engineering" supported this study (project PBZ-KBN-082/T08/2002).

References

- [8] Kiernan J.A., "Histological and histochemical methods. Theory and practise", Pergamon Press, (1992).
- [9] Pearse E.A.G. "Histochemistry Theoretical and Applied", Churchill Livingstone Longman Group, London (1991).
- [10]. Jakóbsiak M. red., "Immunologia". Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, (2000).
- [11] Anderson J.M., Shive M.S., "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres", *Advanced Drug Delivery Reviews* 28: (1997): 5-24.
- [12] Kao W.J., Lee D., "In vivo modulation of host response and macrophage behavior by polymer networks grafted with fibronectin-derived biomimetic oligopeptides: the role of RGD and PHSRN domains", *Biomaterials* 22 (2001): 2901-2909.
- [13] Middleton J.C., Tipton A.J., "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices", *Biomaterials* 21 (2001): 2335-2346.
- [14] Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K., "The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors", *Tissue Engineering* 7 (2001): 679 - 689.
- [15] Cai Q., Guixin S., Jianzhong B., Wang S., "Enzymatic degradation behavior and mechanism of Poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin", *Biomaterials* 24 (2003): 629-638.

ZASTOSOWANIE IMPLANTÓW W OKULISTYCE

RAFAŁ LESZCZYŃSKI, BOŻENA KAMIŃSKA-OLECHNOWICZ, MARIA FORMIŃSKA-KAPUŚCIK

KATEDRA I KLINIKA OKULISTYKI
ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie osiągnięć i rodzących się wyzwań, jakie stawia przed inżynierią materiałową okulistyka.

W wielu schorzeniach narządu wzroku lekarze okuliści zmuszeni są wszczepiać implanty, których celem jest przywrócenie kształtu, wyglądu, a przede wszystkim funkcji narządu wzroku. Wszczepy z metali szlachetnych, szkła i porcelany zastępowane są

IMPLANTS IN OPHTHALMOLOGY

RAFAŁ LESZCZYŃSKI, BOŻENA KAMIŃSKA-OLECHNOWICZ, MARIA FORMIŃSKA-KAPUŚCIK, RADOŚLAW DYSZAK

DEPARTMENT OF OPHTHALMOLOGY
SILESIAN UNIVERSITY OF MEDICINE, KATOWICE, POLAND

Abstract

The aim of the study is to present achievements of ophthalmology and how it challenges material engineering.

In various diseases of an organ of vision ophthalmologist have to insert grafts whose aim is to restore shape, appearance and, first of all, function of an organ of sight. Grafts made of biomaterials are substituted for those made of precious metals, glass and porcelain. Present development of material engineering allows to design such physical features