

OCENA GOJENIA RAN KOSTNYCH ŻUCHWY KRÓLIKÓW WYPEŁNIONYCH KOPOLIMEREM P(LLA/ GLA) WZMACNIANYM WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI

MAGDALENA PROSZEK*, MAREK ADWENT**,
AGATA CIEŚLIK-BIELECKA**, GRZEGORZ BAJOR***,
DANIEL SABAT****, TADEUSZ CIEŚLIK**, ANNA MORAWSKA*****

*KATEDRA I ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO
ŚL.AM, BYTOM

**I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ
ŚL.AM, ZABRZE

***KATEDRA CHIRURGII DZIECIĘCEJ ŚL.AM, KATOWICE

****KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII ŚL.AM, ZABRZE

*****AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW

Streszczenie

Celem pracy była ocena niektórych właściwości biologicznych kompozytu otrzymanego z biodegradowalnego kopolimeru glikolidu z laktidem wzmocnionego włóknami węglowymi. Wyniki przeprowadzonych badań na zwierzętach poddano ocenie klinicznej, radiologicznej i histopatologicznej. Uzyskane wyniki badań wykazały, iż badany materiał nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych, a najbardziej aktywny proces odnowy tkanki kostnej następuje między 14 a 21 dobą, natomiast mineralizacji pomiędzy 6 a 12 tygodniem obserwacji.

Słowa kluczowe: biomateriały, materiały biodegradowalne, kopolimer P(LLA/GLA), włókna węglowe, regeneracja tkanki kostnej, badania na zwierzętach [Inżynieria Biomateriałów, 38-43, (2004), 242-246]

Wprowadzenie

Od szeregu lat dzięki znacznemu rozwojowi techniki i wprowadzeniu nowych technologii w zabiegach odtwórczych stosuje się w medycynie tzw. "materiały obce" tj. tworzywa metaliczne, materiały ceramiczne, polimery czy kompozyty - określane jako biomateriały. Mogą one stanowić rusztowanie dla wrastających w nie tkanek otaczających, ale dość często stosowane są jako elementy podporowe lub stabilizujące. Powinno je charakteryzować szereg odpowiednich właściwości fizycznych, chemicznych czy mechanicznych, ale nade wszystko nie powinny wywoływać alergii ani posiadać właściwości toksycznych czy nowotworogennych [1, 2]. W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań in vitro i in vivo z zastosowaniem różnorodnych polimerów. Uzyskane pozytywne wyniki badań doprowadziły do ich klinicznego zastosowania. Przykładami takich materiałów są polilaktyd (PLA), poliglikolid (PGA), polisulfon (PSU) czy włóknisty materiał węglowy w postaci kompozytu węgiel-węgiel (C-C) [1, 3]. Każdy z tych materiałów posiada szereg zalet, między innymi dużą porowatość, brak toksyczności, oraz

HEALING ESTIMATION OF RABBITS MANDIBLE OSSEOUS WOUNDS FILLED WITH LACTIDE- GLYCOLIDE CO-POLYMER REINFORCED BY CARBON FIBERS

MAGDALENA PROSZEK*, MAREK ADWENT**,
AGATA CIEŚLIK-BIELECKA**, GRZEGORZ BAJOR***,
DANIEL SABAT****, TADEUSZ CIEŚLIK**, ANNA MORAWSKA*****

*DEPARTMENT & SECTION OF STOMATOLOGICAL MATERIALS
SCIENCE OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, BYTOM

**I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL
SURGERY OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

***DEPARTMENT OF CHILDREN SURGERY OF SILESIA MEDICAL
ACADEMY, BYTOM

****DEPARTMENT OF PATHOMORFOLOGY OF SILESIA MEDICAL
ACADEMY, ZABRZE

*****AGH-UST, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERA-
MICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, CRACOW

Abstract

The main purpose of this investigation was estimation of some biological properties of biodegradable lactide-glycolide co-polymer reinforced by carbon fibres. The results of the research subjected to clinical, radiological and histopathological estimation. The tested material caused lack of local and general negative reactions, the most active process of osseous tissue regeneration was between 14 and 21 day, however the most mineralization was between 6 and 12 week of observation.

Keywords: biomaterials, biodegradable materials, lactide-glycolide co-polymer, carbon fibres, osseous tissue regeneration, experiments on animals [Engineering of Biomaterials, 38-43, (2004), 242-246]

Introduction

From a lot of years thanks to considerable growth of the technology and introduction of new production engineering in reconstructive operations it's used for medical application "foreign materials" - biomaterials - like metal, ceramic, polymer or composite materials. They can be use as scaffold for growing in surrounding tissues but also as supporting and stabilizing elements. These materials should have right physical, chemical and mechanical properties but above all they shouldn't call out allergy and toxic or carcinogenic reactions [1, 2].

In recent years it was done a lot of in vitro and in vivo examinations using varied polymer materials. The positive results received during the tests led to their clinical applications. The examples of these materials are polylactide (PLA), polyglycolide (GLA), polysulfone (PSU) or carbon-carbon composites (C-C) [1, 3]. Each of its have a number of advantages, among others a proper porosity, lack of toxicity and biocompatibility manifesting themselves lack of

biogodność przejawiającą się brakiem odczynu typu "około ciała obcego". Mają jednak i wady, do których należy głównie kruchość, mała wytrzymałość na zginanie, co eliminuje te materiały jako elementy podporowe. Zauważono jednak, iż łącząc je i tworząc tzw. kopolimery można uzyskać szereg korzystniejszych właściwości [1].

Kopolimery laktidu z glikolidem są typowymi materiałami termoplastycznymi, dzięki czemu możliwe jest wytwarzanie z nich, np. metodą wtrysku czy wytłaczania, wyrobów przeznaczonych dla medycyny. Odnaczają się jednak stosunkowo słabymi parametrami mechanicznymi, co ogranicza ich medyczne zastosowania do przypadków, gdzie nie muszą przenosić znacznych obciążeń. Optymalnym sposobem poprawy właściwości mechanicznych jest zbrojenie tych materiałów różnego rodzaju włóknami syntetycznymi, np. węglowymi [4, 5].

Celem niniejszej pracy była ocena niektórych właściwości biologicznych kompozytu otrzymanego z kopolimeru glikolidu z laktidem wzmocnionego włóknami węglowymi - P(LLA/GLA)+CF. Dla zrealizowania tego celu wykonano badania na zwierzętach, a wyniki poddano ocenie klinicznej, radiologicznej i histopatologicznej. Na podstawie badań analizowano czy kopolimer P(LLA/GLA)+CF wywołuje niekorzystne odczyny tkankowe, w jakich okresach badawczych dochodziło do najbardziej aktywnego procesu odbudowy kości i mineralizacji tkanki kostnej oraz czy kopolimer P(LLA/GLA)+CF wpływał na spowolnienie czy też przyspieszenie odnowy tkanki kostnej w porównaniu z grupą kontrolną.

Material i metody

W pracy zastosowano kompozyt otrzymany z niezawierającego toksycznych domieszek kopolimeru glikolidu z laktidem (18:82) wzmocniony włóknami węglowymi o długości 3 mm. Udział objętościowy włókien wynosił 15%.

Do badań doświadczalnych na 24 królikach (mieszance różnej płci o wadze od 2600 - 3200 gramów) użyto materiał w postaci walców o średnicy 3,2 mm.

Podczas operacji zastosowano znieczulenie ogólne (premedykacja - Diazepam i Atropina, znieczulenie - Ketamina).

Z cięcia obustronnego u podstawy żuchwy docierano do jej bocznych powierzchni. Frezem wykonywano ubytki kostne o średnicy około 3,2 mm na obu powierzchniach bocznych. Ubytki po stronie lewej pozostawiono do wypełnienia skrzepem krwi (grupa kontrolna), a po stronie prawej wypełniono badany kopolimerem P(LLA/GLA)+CF (grupa badana). Na grzbiecie zwierząt wzdłuż kręgosłupa lędźwiowego wykonano nacięcia skóry. Po lewej stronie kręgosłupa pod skórą wytworzono kieszeń, po prawej natomiast rozwarstwiono mięśnie grzbietu. W tak przygotowane miejsca wprowadzono badany materiał. Rany po obu stronach zaszywano warstwowo "Dexonem".

W okresie pooperacyjnym zwierzęta nie otrzymywały żadnych leków.

U wszystkich zwierząt wykonywano obserwacje kliniczne przebiegu gojenia ran, a po ich zabiciu badania radiologiczne, makroskopowe i histopatologiczne w 7, 14 i 21 dobie, oraz w 6, 12 i 24 tygodniu doświadczenia.

W ocenie klinicznej uwzględniono zachowanie zwierząt oraz gojenie ran.

Ocenę radiologiczną wykonano na podstawie rentgenowskich zdjęć zębowych obejmujących część trzonu żuchwy wraz z zębami i ubytkami kostnymi.

Makroskopowo oceniano wygląd ubytków i tkanek kostnych bezpośrednio je pokrywających.

W badaniach histopatologicznych oceniano tkankę kostną

foreign body type reaction. They have also a lot of disadvantages, for example fragility or low bending strength, which eliminate these materials as supporting elements. It was observed that thanks to jointing these materials and formation of co-polymers it can obtain many better properties [1]. The lactide-glycolide co-polymers are typical thermoplastic materials and therefore it is possible to shape them by injection moulding to obtain the articles for medical applications. However, they have relatively low mechanical parameters which essentially limit the applications to the regions where it's not necessary that they bear significant loads. It seems that reinforcement with some synthetic fibres like carbon fibres might greatly improve their mechanical properties.

The main purpose of this investigation was estimation of some biological properties

of biodegradable lactide-glycolide co-polymer reinforced by carbon fibres - P(LLA/GLA)+CF. For that purpose it was carried out research on animals which next was subjected to clinical, radiological and histopathological estimation. On the base received of results firstly it was analyzed does the lactide-glycolide co-polymer call out adverse tissue reactions, secondly in which research periods the most process of bone reconstruction and osseous tissue mineralization was observed and thirdly does the P(LLA/GLA)+CF co-polymer influence on acceleration or slowdown of osseous tissue regeneration compared to control group.

Material and methods

In this work used composite obtained from a lactide-glycolide (18:82) co-polymer without any toxic additives reinforced by 3 mm long carbon fibres. The volume fraction of carbon fibres in the composite was 15%.

The experimental study was performed on 24 rabbits (both sex and weight between 2600-3200 g) and the using material was in 3,2 mm diameter cylinder state.

During the surgery all animals received diazepam and atropine premedication and then were anaesthetized with ketamine.

In the first stage of surgery bilateral incision over mandible corpus was made and the bone was exposed. The canal in the bone on the both flanks was made with 3,2 mm diameter bur. Then the canals on the left was filled with blood clot (control group) and the canals on the right tested composite P(LLA/GLA)+CF (experimental group). In the second stage of surgery under skin on the left side of backbone was made pocket however on the right side separated the muscles of the back, implants were placed in the both openings. In the all cases Dextron was used to wounds suture.

For all animals clinical examination and then (after the rabbits were killed) radiological, histopathological and macroscopy investigations were executed in 1, 2, 3, 6, 12 and 24 week of examination.

The behaviour of animals and healing of surgical wounds were observed during clinical examination.

The radiological investigation performed on the basis of X-ray tooth pictures including part of body of the mandible with tooth and bone defects.

The appearance of bone defects and osseous tissue was estimated during macroscopy investigation.

The osseous tissue which was situated in and around of bone defects, subcutaneous and muscular tissue from area of lumbar backbone were estimated during histopathological investigations. It was investigated internal organs (kidney and liver) of the animals, too.

w miejscu wykonywanych ubytków i z otoczenia, ponadto tkankę podskórną i mięśniową z okolic kręgośłupa lędźwiowego. Badano również narządy wewnętrzne zwierząt doświadczalnych (wątrobę i nerki). Pobrane fragmenty tkanek przeprowadzono w sposób typowy.

Wyniki i dyskusja

Obserwacje kliniczne

W okresie pooperacyjnym zwierzęta zachowywały się spokojnie. Po 2 godzinach od zakończenia zabiegu rozpoczynały picie wody, a następnie przyjmowanie karmy. Przez cały czas nie wykazywały oznak zniecierpliwienia (brak bólu pooperacyjnego). Do 3 doby po zabiegu w otoczeniu ran skórnych widoczny był obrzęk tkanek, gdzieśgdzie widoczne były zaczerwienienia wokół szwów - nie stwierdzono objawów chęłbotania (brak krwika lub też obfitej wydzieliny przyrannej). Przez cały okres obserwacji nie zauważono rozchodzenia się ran. Okres całkowitego wygojenia ran zamykał się między 10 - 14 dniem (usuwanie szwów), a mierne zgrubienia tkanek (głównie skóry i tkanki podskórnej) były niedostrzegalne od 21 doby doświadczenia. Przez cały okres doświadczenia obserwowano stały przyrost masy ciała królików.

Badania radiologiczne

W 7 dobie, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, widoczne było kuliste przejaśnienie o regularnych brzegach, wielkością odpowiadające wykonanemu ubytkowi tkanki kostnej.

W późniejszym okresie obserwowano zmniejszające się już nieregularne przejaśnienie, które w grupie badanej było widoczne w postaci drobnych punkcików, przeważały jednak wypowate cienie.

W 24 tygodniu ubytek kostny wypełniony był już zmineralizowaną tkanką, co widoczne było w postaci zaznaczonego zacienienia.

Ocena makroskopowa

W obu grupach w pierwszym tygodniu tkanki pokrywające ubytek kostny dały się łatwo preparować, co stało się trudniejsze już w 14 dobie, gdyż tkanki pokrywające ubytek ściśle przylegały do kości i miały większą spoistość. W 6 i 12 tygodniu obserwacji ubytek tkanki kostnej pokryty był miejscami tkanką o wyglądzie kości, w grupie badanej jej powierzchnia była porowata i usłana drobnymi, ledwo dostroczalnymi zagłębieniami. W 24 tygodniu ubytek w całości pokryty był tkanką kostną i makroskopowo miejsce wykonanego ubytku nie różniło się od otoczenia.

Badania histopatologiczne

W tkance kostnej do 14 doby obserwacji obrazy histopatologiczne w obu grupach nie wykazywały znacznych różnic. Widoczny był wyraźnie uformowany ubytek pokryty przez młodą tkankę łączną włóknistą z cechami aktywnej odbudowy tkanki kostnej pod postacią licznych pasm młodych, niedojrzałych beleczek kostnych obrzeżonych osteoblastami. Ponadto obecne były martwicze resztki tkanki kostnej otoczone osteoklastami, a w grupie badanej pojedyncze włókna węglowe umiejscowione na dnie ubytku. W tkance łącznej włóknistej uwidoczniły się włókna kolagenowe oraz niedojrzałe i dojrzałe beleczki kostne pokryte osteoblastami (RYS. 1). W 21 dobie w grupie kontrolnej aktywność osteoblastyczna obserwowano w niektórych beleczkach kostnych (w innych kość wykazywała cechy dojrzałości), a w grupie badanej jedynie w znajdującej się głębiej tkance łącznej włóknistej.

W tkance podskórnej po tygodniu obserwacji wszczep otoczenia,

Results and discussion

Clinical examinations

The animals behaved calm in postoperative period. After 2 hours from the end of surgery they started to drink water and next eat the fodder. All the time they weren't impatient (lack of postoperative pain). The tissues edema around the skin wounds and redness around the sutures were observed to the 3 week of experiment - there was no fluctuation symptom (lack of hematoma or wound secretion). For all the time of observation the wounds didn't parted. The period of complete healing of the wounds was between 10 and 14 day of experiment (time of sutures removal), mediocre pachyderma was observed to 21 day of experiment. For all period of experiment it was observed changeless weight gain of the rabbits.

Radiological investigations

In 7 day of experiment radiological study of mandible showed round alight with regular border which dimension was such as the bone defect. In later period the alight was got smaller and irregular and in experimental group it was observed in shape of small points, there were a lot of local shades. In 24 week the bone defect was filled with mineralized tissue what was observed in shape of marked shade.

Macroscopy investigation

In both groups in first week of experiment the preparation of tissues covering the bone defect was easy what in 14 day of observation became already more difficult because tissues covering bone defect adhered more to the bone and had more cohesion. In 6 and 12 week of experiment the bone defect was local covered with similar to bone tissue, its surface in experimental group was porous and covered with small and hardly discernible hollows. After 24 week period examination whole bone defect was covered with osseous tissue and the place of defect didn't differ from surroundings.

Histopathological investigations

In the osseous tissue to 14 day of observation in both groups histopathological pictures didn't show considerable differences. It was shown the bone defect covered with young fibrous tissue with features of active osseous tissue reconstruction assuming shape of numerous bands of young and immature osseous trabeculas which were surrounded with osteoblasts. Besides there were necrotic leavings of osseous tissue what was surrounded with osteoclasts. In experimental group there were the single carbon fibers on the bottom of defect. The collagenic fibres, besides immature and mature osseous trabeculas covered with osteoblasts were visible (FIG. 1). In 21 day in the control group osteoblasts were in some osseous trabeculas (in others the bone was mature) and in the experimental group they were only in deeper situated fibrous tissue.

After one week of observation in the subcutaneous tissue a graft was surrounded with a connective tissue capsule with some carbon fibres which remained during removal of the graft. In later period a connective tissue capsule became thicker and there were onenuclear phagocytic cells, which sometimes blended and created giant multinuclear cells on its surface (FIG. 2). The scraps of carbon fibres and tested material were surrounded with macrophages which created small foreign body granulomas. After 21 days of observation a connective tissue capsule was built mainly with collagenic fibres and few macrophages. In same places around capsule a connective tissue scar and regeneration of damaged muscle fibres was observed.

czony był cienką torebką łącznotkankową z widocznymi miejscami fragmentami włókien węglowych po usunięciu wszcepie. W późniejszym okresie torebka łącznotkankowa stała się pogrubiała, a na jej powierzchni obecne były jednojądrowe komórki fagocytarne, czasami zlewające się i tworzące komórki olbrzymie wielojądrowe (RYS. 2). Fragmenty włókien węglowych i badanego materiału otoczone były przez makrofagi tworzące drobne ziarniaki typu około ciała obcego. Po 21 dniach obserwacji torebka łącznotkankowa zbudowana była głównie z włókien kolagenowych i nielicznych makrofagów.

W niektórych miejscach wokół torebki obserwowano cechy tworzenia się blizny łącznotkankowej i regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych.

Początkowa obserwacja tkanki mięśniowej wokół wszczepu wykazała obecność młodej tkanki łącznej włóknistej z bogatą siecią włosowatych naczyń krwionośnych wnikaющей pomiędzy uszkodzone włókna mięśni poprzecznie prążkowanych (RYS. 3). W dalszym etapie w tkance włóknistej pojawiły się włókna kolagenowe, a w tkankach poza wszczepem nieliczne olbrzymiokomórkowe ziarniaki typu około ciała obcego wytworzone wokół luźnych fragmentów włókien węglowych. Po 3 tygodniach obserwacji wokół wszczepu wytworzyła się gruba bliznowaciejąca torebka łącznotkankowa zbudowana z włókien kolagenowych i fibroblastów. Na obwodzie zmian widoczne były cechy regeneracji włókien mięśniowych z pomnożeniem jąder komórkowych. W badanych narządach wewnętrznych (nerki i wątroba) nie wykazano żadnych zmian patologicznych związanych z zastosowanymi wszczepami.

Podsumowanie

Kopolimer P(LLA/GLA)+CF nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych.

Wydaje się, iż najbardziej aktywny proces odnowy tkanki kostnej następuje między 14 a 21 dobą, a mineralizacji pomiędzy 6 a 12 tygodniem obserwacji.

Podziękowania

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

Initial observations of muscle tissue showed a young fibrous tissue with a lot of capillary blood vessels penetrating between damaged fibres of skeletal muscles (FIG. 3). In next period in fibrous tissue a collagenic fibres were observed. Besides there were few gigantocellular foreign body granulomas around scarp of carbon fibres in tissue out of graft. After 3 weeks period it was shown thick cicatricial connective tissue capsule built with collagenic fibres and fibroblasts. On the periphery of changes it was shown features of muscle fibres regeneration in conjunction with multiplication of nucleuses.

The histopathological evaluation of kidney and liver did not demonstrate any pathological changes.

Conclusion

Lactide-glycolide co-polymer caused lack of local and general negative reactions.

It seems that the most active process of osseous tissue regeneration was between 14 and 21 day, however the most mineralization was between 6 and 12 week of observation.

Acknowledgements

The work was carried out under Contract No. 3 T09B 010 17 financed by the Polish Committee for Scientific Research.

Piśmiennictwo

References

- [1] Będziński R.: Biomechanika inżynierska, Oficyna Wyd. PW, Wrocław (1997).
- [2] Chłopek J., Kmita G., Dobrzyński P., Bero M.: Właściwości zmęczeniowe śrub z kopolimeru P(LLA/GLA) oraz kopolimeru wzmacnianego włóknami węglowymi. Inżynieria Biomateriałów, 23,24,25, 88-90 (2002).
- [3] Cieślak T., Wróbel J., Chłopek J.: Polisulfon wzmocniony włóknem węglowym jako element stabilizujący złamanie kości twarzy. Inżynieria Biomateriałów, 30,31,32,33, 112-115 (2003).
- [4] Pamuła E., Chłopek J., Błażewicz M. i wsp.: Materiały kompozytowe z nowego biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktyd dla celów medycznych. Inżynieria Biomateriałów, 12, 23-28 (2000).
- [5] Konieczna B., Pamuła E.: Polimery termoplastyczne wzmacniane włóknami węglowymi do zastosowań medycznych. Inżynieria Biomateriałów, 17, 18, 19, 77-79 (2001).



RYS. 1. Liczne niedojrzałe i dojrzałe beleczki kostne pokryte osteoblastami. Barw. H.E., pow. 200x.

FIG. 1. Immature and mature osseous trabeculas covered with osteoblasts (H&E, 200x).

RYS. 2. Pogrubiała torebka łącznotkankowa wokół wszczepu. Barw. H.E., pow. 100x

FIG. 2. Thick connective tissue capsula around graft (H&E, 100x).

RYS. 3. Tkanka łączna włóknista rozrastająca się pomiędzy uszkodzonymi pęczkami włókien mięśniowych. Barw. H.E., pow. 100x.

FIG. 3. Fibrous tissue penetrating between damaged fibres of skeletal muscles (H&E, 100x).