

# OCENA MORFOMETRYCZNA PROCESU BIODEGRADACJI WŁÓKIEN WĘGLOWYCH KOMPOZYTÓW WĘGIEL-OSNOWA EPOKSYDOWA HYDROKSYAPATYT W 22 TYGODNIOWYM OKRESIE OBSERWACJI

EWA ZEMBALA-NOŻYŃSKA\*, GRZEGORZ BAJOR\*\*,  
JERZY NOŻYŃSKI\*\*\*, WOJCIECH ŚCIERSKI\*\*\*\*,  
ADAM GRZYBOWSKI\*\*\*, DANIEL SABAT\*

\*KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII W ZABRZU ŚLĄSKIEJ  
AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH

\*\*KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII DZIECIĘCEJ ŚLĄSKIEJ AKADEMII  
MEDYCZNEJ W KATOWICACH

\*\*\*ŚLĄSKIE CENTRUM CHOROÓB SERCA W ZABRZU

\*\*\*\*KATEDRA I KLINIKA OTOLARYNGOLOGII W ZABRZU ŚLĄSKIEJ  
AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH

## Wprowadzenie

W ostatnich dziesięcioleciach opracowano biomateriały ulegające biodegradacji. Materiały te nie wymagają powtórnego zabiegu operacyjnego celem usunięcia wykonanych z nich elementów zespalających, w przeciwieństwie do dotychczas stosowanych w chirurgii i traumatologii elementów metalowych. Wcześniej prowadzone badania nad implantacją kompozytów węgiel-węgiel prócz szeregu ich zalet, wykazały także wady w postaci dużej kruchości, łamliwości. Próba pokonania tych cech kompozytu jest wprowadzenie włókien węglowych do odpowiedniej osnowy stanowiącej element wzmacniający. Efektem jest wytworzenie kompozytu włókno węglowe-polimer, posiadające elastyczność i tolerancję w ludzkim organizmie. Polimerem tworzącym osnowę jest żywica epoksydowa należąca do materiałów termoutwardzalnych. Dodatkowe pokrycie takiego implantu hydroksyapatytem odgrywa korzystny wpływ na przyspieszenie zdolności do bezpośredniego łączenia się z tkanką kostną [1]. Celem badania jest morfometryczne prześledzenie biodegradacji w różnych okresach czasu kompozytu węgiel-węgiel-osnowa epoksydowa-hydroksyapatyt implantowanego śródkostnie do jamy szpikowej królikom.

## Material i metodyka

Wykonano śródszpikową implantację królikom sztyftów będących implantami kompozytu włókna węglowego z osnową epoksydową (C-C-Ep-HAP). Po 4, 14, 20 i 22 tygodniu zwierzęta usypiano, zaś z fragmentów kości i implantu wykonywano preparaty histologiczne, które analizowano wykorzystując system analizy obrazu Quantimet Leica. Oceniono morfometrycznie: 1. wymiar najkrótszy odpowiadający szerokości włókien węglowych, 2. obliczoną szerokość włókien węglowych, 3. współczynnik wypełnienia, 4. średni

# MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF BIODEGRADATION PROCESS OF CARBON COMPOSITES OF THE CARBON-EPOXIDE WRAP AND HYDROXYAPATITE AFTER 22-WEEK OBSERVATION

EWA ZEMBALA-NOŻYŃSKA\*, GRZEGORZ BAJOR\*\*,  
JERZY NOŻYŃSKI\*\*\*, WOJCIECH ŚCIERSKI\*\*\*\*,  
ADAM GRZYBOWSKI\*\*\*, DANIEL SABAT\*

\*CHAIR AND DEPARTMENT OF PATHOMORPHOLOGY, SILESIAN  
MEDICAL UNIVERSITY IN KATOWICE, ZABRZE, POLAND

\*\*CHAIR AND CLINIC OF PEDIATRIC SURGERY, SILESIAN MEDICAL  
UNIVERSITY IN KATOWICE, POLAND

\*\*\*SILESIAN CENTER FOR HEART DISEASES, ZABRZE, POLAND,

\*\*\*\*CHAIR AND DEPARTMENT OF OTORHINOLARYNGOLOGY,  
SILESIAN MEDICAL UNIVERSITY IN KATOWICE, ZABRZE, POLAND

## Introduction

In the recent decades biodegradable biomaterials have been invented. The material does not need another operation to remove them, as opposed to metal elements used in surgery and traumatology. Earlier studies on carbon-carbon composite implantation apart from many advantages showed that they also have faults of being fragile and breakable. Another attempt to improve composite profile is an introduction of a special reinforcing wrap. The result is a composite consisting of carbon-polymer fibre possessing elasticity in a human body. Polymer that makes a wrap consists of epoxide resin, one of thermohardening materials. Additional covering of the implant by hydroxyapatite has positive influence quicker direct connecting (combining) with bone tissue [1]. The aim of morphometric study is an observation in different time periods of a carbon-carbon, epoxide wrap, hydroxyapatite composite implanted into the bone, in the marrow cavity of rabbits.

## Materials and methods

Implantation of pins into rabbit's bone marrow was performed. The pins were implants of carbon fibre composite with epoxide wrap and hydroxyapatite (HAP) (C-C-Ep-HAP). After 4, 14, 20 and 22 weeks the animals were sacrificed under general anaesthesia, then bone and implant fragments were routinely histologically processed for further microscopical image analysis with Quantimet Leica. This analysis included: 1. the breadth responding to the shortest diameter of carbon fibres, 2. curve length of carbon fibres, 3. fullness factor coefficient, 4. mean gray level reflecting density of the material - optic density. The results were analyzed statistically.

Tydzień obserwacji	Liczba	Mediana	Minimum	Maksimum	Kwartył dolny	Kwartył górny
Observation week	Number	Median	Minimum	Maximum	Lower quartile	Upper quartile
Wymiar najkrótszy / Breadth						
22	251	1.538	0.385	39.231	0.769	4.231
20	558	1.923	0.385	85.385	0.769	5.385
14	544	1.538	0.385	53.461	0.769	4.615
4	164	6.538	0.385	38.077	1.538	8.846
Obliczona szerokość / Curve width						
22	251	1.154	0.385	10.769	0.769	2.692
20	558	1.538	0.385	10.769	0.769	3.462
14	544	1.538	0.385	10.385	0.769	3.462
4	164	4.615	0.385	11.538	1.538	6.538
Współczynnik wypełnienia / Fullness factor						
22	251	0.964	0.533	1.371	0.853	1.087
20	558	0.951	0.575	1.371	0.857	1.057
14	544	0.983	0.447	1.371	0.8845	1.079
4	164	0.931	0.592	1.25	0.8505	0.9735
Średni stopień szarości / Mean grey level						
22	251	44.760	22.000	97.571	40.000	52.500
20	558	44.754	23.900	89.461	39.963	51.506
14	543	44.119	25.777	61.900	39.238	48.500
4	164	43.408	31.250	58.600	40.925	48.434

TABELA 1. Charakterystyka morfometryczna procesu biodegradacji włókien kompozytów węgiel-osnowa epoksydowa-hydroksyapatyt w kolejnych tygodniach.

TABLE 1. Morphometric characteristics of the biodegradation process of the fibres of carbon-epoxide wrap-hydroxyapatite composite in subsequent weeks.

stopień szarości odzwierciedlający gęstość materiału - gęstość optyczną. Wyniki opracowano statystycznie.

Porównywane tygodnie Compared weeks	Wartość Value			
	Wymiar najkrótszy Breadth	Obliczona szerokość Curve width	Współczynnik wypełnienia Fullness factor	Średni stopień szarości Mean grey level
4 tygodnie versus 14 tygodni 4 <sup>th</sup> week versus 14 <sup>th</sup> week	0.000001	0.000001	0.000001	0.57
14 tygodni versus 20 tygodni 14 <sup>th</sup> week versus 20 <sup>th</sup> week	0.32	0.12	0.0021	0.002
20 tygodni versus 22 tygodnie 20 <sup>th</sup> week versus 22 <sup>th</sup> week	0.26	0.005	0.45	0.8

TABELA 2. Porównanie wartości morfometrycznych kompozytu węgiel-osnowa epoksydowa hydroksyapatyt implantowanych śródkostnie królikom.

TABLE 2. The comparison of morphometric values of the fibres of carbon-epoxide wrap-hydroxyapatite composite implanted into bones in rabbits.

## Results

The results are compared in TAB. 1-4. The breadth showed initially a significant decrease of mean value, afterwards insignificant increase and then decrease of value oc-

Tydzień implantacji Week of implantation	Wartość Value					
	Wymiar najkrótszy Breadth		Obliczona szerokość Curve width		Współczynnik wypełnienia Fullness factor	
	Spearman R	p	Spearman R	P	Spearman R	p
4 tygodnie 4 <sup>th</sup> week	-0.311	10 <sup>-3</sup>	-0.307	10 <sup>-3</sup>	0.157	0.044
14 tygodni 14 <sup>th</sup> week	-0.191	10 <sup>-1</sup>	-0.218	10 <sup>-5</sup>	0.219	10 <sup>-6</sup>
20 tygodni 20 <sup>th</sup> week	-0.167	10 <sup>-5</sup>	-0.206	10 <sup>-5</sup>	0.067	0.11
22 tygodnie 22 <sup>th</sup> week	-0.464	10 <sup>-6</sup>	-0.369	10 <sup>-6</sup>	0.419	10 <sup>-6</sup>

TABELA 3. Korelacja średniego stopnia szarości z wartościami morfometrycznymi włókien kompozytu węgiel-osnowa epoksydowa- hydroksyapatyt implantowanych śródkostnie królikom.

TABLE 3. Correlation of the mean grey level with morphometric values of the fibres of carbon-epoxide wrap-hydroxyapatite composite implanted into bones in rabbits.

Wymiar najkrótszy Breadth		Obliczona szerokość Curve width		Współczynnik wypełnienia Fullness factor		Średni stopień szarości Mean grey level	
Spearman R	p	Spearman R	p	Spearman R	p	Spearman R	p
-0.081	10 <sup>-6</sup>	-0.132	10 <sup>-3</sup>	0.014	0.58	0.467	10 <sup>-9</sup>

**TABELA. 4. Korelacja czasu obserwacji z wartościami morfometrycznymi włókien kompozytu węgiel-osnowa epoksydowa hydroksyapatyt implantowanych śródkostnie królikom.**

**TABLE 4. The correlation of the time of implantation with the morphometric values of the fibres of carbon-epoxide wrap-hydroxyapatite composite implanted into bones in rabbits.**

## Wyniki

Wyniki zestawiono w TAB. 1-4. Wymiar najkrótszy wykazywał początkowo istotny spadek wartości przeciętnej, po czym następował niezamienny wzrost a następnie spadek wartości. Podobnie zachowywała się obliczona szerokość włókien węglowych. Współczynnik wypełnienia wskazywał na ujawnianie się najwyraźniejszych wżerów resorpcyjnych w 14 i 22 tygodniu implantacji, aczkolwiek wahania nie były znamienne statystycznie. Gęstość optyczna ujawniała stopniowy wzrost wartości przeciętnej do 20 tygodnia. Analiza korelacji gęstości optycznej z parametrami morfometrycznymi wykazała istotną korelację ujemną z wymiarem najkrótszym oraz obliczoną szerokością włókien, najsilniejsze w 4 i 22 tygodniu obserwacji. Z kolei współczynnik wypełnienia ujawniał korelację dodatnią, najsilniejszą w 22 tygodniu. Korelacja mierzonych parametrów z czasem wskazywała na najsilniejszą i dodatnią korelację z gęstością optyczną.

## Dyskusja

Proces biodegradacji wykazywał zaobserwowane w poprzednich badaniach wahania wymiarów liniowych włókien kompozytu [1, 2, 3, 4, 5]. Stosunkowo szerokie włókna wykazywały postępujące scienczenie najlepiej odzwierciedlone w postaci obliczonej szerokości. Wymiar najkrótszy wykazywał wahania, spadek wartości, jej wzrost i spadek. Średni stopień szarości wskazuje na istotne rozluźnienie struktury pomiędzy 14 a 20 tygodniem. Analiza korelacji ujawnia jako najbardziej znamienne rozrzedzenie gęstości optycznej wraz z czasem upływającym od implantacji z towarzyszącym scienzeniem włókien i pojawieniem się w nim nieregularności w 22 tygodniu. Morfometryczna analiza biodegradacji włókniny węglowej bądź implantowanych nici węglowych była tematem doniesień autorów [2, 3, 4, 5]. Bezpośrednie porównanie wartości liczbowych wskazuje na niższe wartości pomiarów geometrycznych oraz zmienność średniego stopnia szarości w kompozycie C-C-Ep-HAP, co niewątpliwie związane jest z oddziaływaniem wrastającej w kompozyt kości jak i odmiennych warunków tkankowych. Istotne staje się jednak prześledzenie trendów zmian. W przypadku nici węglowej implantowanej podśluzówkowo obserwowano wzrost wymiaru najkrótszego i obliczonej szerokości pomiędzy 4 a 12 tygodniem, oraz spadek współczynnika wypełnienia przy nieznacznych wahaniami średniego stopnia szarości [4, 5]. W zbliżonych okresach obserwacyjnych, pomiędzy 6 a 24 tygodniem implantacji obserwowano stopniowy spadek wymiaru najkrótszego i obliczonej szerokości włókien włóknin węglowych, narastanie

currred. The curve width of carbon fibres behaved in a similar manner. Fullness factor indicated the appearance of resorptive irregularities, pits in the 14th and 22nd week of the implantation, however the fluctuations were not statistically significant. Optical density (mean grey level) disclosed gradual increase of mean value till the 20th week. Analysis of optical density correlation with morphological parameters showed a significant negative correlation with the shortest breadth and the calculated fibre width, strongest in the 4th and 22nd week of observation. Then the fullness factor disclosed a positive correlation, strongest in the 22nd week. The correlation of the measured parameters indicated, after some time, the strongest and positive correlation with optical density

## Discussion

Biodegradation process showed, observed in earlier studies, fluctuations of linear dimensions of composite fibres [1, 2, 3, 4, 5]. Relatively wide fibers indicated progressive 'thinning' reflected best in the curve width. The breadth showed fluctuations, decrease of value, its increase and decrease. Mean value of gray level indicates significant loosening of structure between the 14th and 20th week. The correlation analysis discloses the most significant dilution of optical density with the time after the implantation along with accompanying fibre thinning and irregularities after the 22nd week. Morphometric analysis of carbon fibre biodegradation or implanted carbon threads (sutures) was a subject of numerous studies [2, 3, 4, 5]. Direct comparison of numerical values indicates lower values of geometrical measurements and significance of mean gray level in composite C-C-Ep-HAP, which is undoubtedly connected with an influence of bone ingrowth into the implant and different tissue conditions. To observe trends of changes has become essential. In case of carbon thread implanted into submucosa an increase of the shortest breadth and the calculated width was observed from the 4th to 12th week, and a decrease of fullness factor with minute fluctuations of mean gray level [4, 5]. In the similar observation periods, from the 4th to 24th week of implantation, a gradual decrease of the breadth and fibre width of carbon fibres, raise of fullness, and increase and decrease of mean grey level value [2, 3]. Only calculated width correlated in a similar way with biodegradation time both in cases of carbon thread biodegradation, carbon fibres and C-C-Ep-HAP composite. While mean gray degree correlated the most strongly with biodegradation time in case of C-C-Ep-HAP polymer. It must be mentioned that each biodegradation process occurred in slightly different tissue conditions and under dissimilar mechanical influences, which can impinge on the measured values. Carbon thread was under changing tension during chewing, next, C-C-Ep-HAP composite was squeezed by the regenerating long bone. Therefore morphometric analysis indicates the essential role of all conditions.

## Conclusion

Morphometric profile of implant biodegradation of carbon-epoxide wrap-hydroxyapatite-composites (C-C-Ep-HAP) shows their stability in the early postoperative period and slight changes in optical density. Essential factor influencing morphometric results of biodegradation process seems regional tissue mechanical and biochemical conditions.

współczynnika wypełnienia, oraz wzrost i spadek średniej szarości [2, 3]. Jedynie obliczona szerokość w zbliżony sposób korelowała z czasem biodegradacji zarówno w przypadku biodegradacji nici węglowej, włókien węglowych i kompozytu C-C-Ep-HAP. Z kolei średni stopień szarości najsilniej korelował z czasem biodegradacji w przypadku polimeru C-C-Ep-HAP. Należy nadmienić, że każdy proces biodegradacji przebiegał w nieco odmiennych warunkach tkankowych jak również przy odmiennych wpływach mechanicznych, mogących rzutować na mierzone wartości. Nic węglowa podawana była zmiennym napięciem podczas żucia, z kolei kompozyt C-C-Ep-HAP ulegał ściśnięciu przez regenerującą kość długą. Analiza morfometryczna wskazuje więc na istotną rolę warunków tkankowych w procesie biodegradacji.

## Wniosek

Charakterystyka morfometryczna biodegradacji implantów kompozytu węgiel-osnowa epoksydowa-hydroksyapatyt (C-C-Ep-HAP) wskazuje na ich stabilność we wczesnym okresie pooperacyjnym i nieznaczne zmiany gęstości optycznej. Zasadniczym czynnikiem wpływającym na wyniki morfometryczne procesu biodegradacji wydają się być narządowe warunki mechaniczne i biochemiczne.

## HYDROKSYAPATYT NATURALNY – PREPARATYKA, WŁAŚCIWOŚCI

KRZYSZTOF HABERKO, MIROSLAW BUĆKO, MARIA HABERKO,  
WŁODZIMIERZ MOZGAWA, ANNA PYDA, JERZY ZARĘBSKI

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,  
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

### Streszczenie

*Opracowano metodę ekstrakcji naturalnego hydroksyapatytu (HAp) z kości zwierzęcych poprzez oddziaływanie na nie gorącym roztworem NaOH. Pozostająca w materiale substancja organiczna ulega utlenieniu w atmosferze powietrza w umiarkowanych temperaturach. W naturalnym hydroksyapatycie występują grupy węglanowe oraz niewielkie udziały magnezu, nieobecne w syntetycznym materiale. Udział grup węglanowych zmniejsza się ze wzrostem temperatury, równocześnie pojawia się wolny CaO. Struktura hydroksyapatytu zostaje jednak zachowana.*

### Wstęp

Hydroksyapatyt, dzięki swojej biogodności i podobieństwu strukturalnemu do mineralnej części kości zwierzęcych i ludzkich wykazuje właściwości osteoindukcyjne. Po wszczępieniu naturalna kość zastępuje stopniowo implant [1, 2]. Porowaty materiał lepiej spełnia zadanie odtworzenia ubytku kostnego niż materiał lity. Wymienić można dwie

## Piśmiennictwo

## References

- [1] Bajor G., Paszenda Z., Bohosiewicz J., Marciniak J.: "Badania kompozytu węglowego w mikroskopie skaningowym po wszczępieniu do tkanki kostnej zwierząt". *Inżynieria Biomateriałów* 1999; 7-8: 37-43.
- [2] Zembala-Nożyńska E., Nożyński J., Sabat D., Dąbrowka K., Cieślik T., Szczurek Z.: "Analiza średniego stopnia szarości w procesie biodegradacji włókien węglowych" *Inżynieria Biomateriałów* 2002; 20: 15-20.
- [3] Zembala-Nożyńska E., Nożyński J., Sabat D., Dąbrowka K., Cieślik T., Szczurek Z.: "Statystyczna analiza parametrów geometrycznych włókien węglowych użytych do wypełnień ubytków tkanki kostnej" *Inżynieria Biomateriałów* 2002; 20: 21-29.
- [4] Dąbrowka K., Zembala-Nożyńska E., Nożyński J.K., Cieślik T.: "Zachowanie się wartości geometrycznych nici węglowej w procesie biodegradacji" *Inżynieria Biomateriałów*, 2002; 21: 15-22.
- [5] Dąbrowka K., Nożyński J., Zembala-Nożyńska E., Błażewicz S.: Średni stopień szarości - obiektywny parametr biodegradacji włókien węglowych. *Inżynieria Biomateriałów* (2001), 13, 3-8.

## NATURAL HYDROXYAPATITE – PREPARATION, PROPERTIES

KRZYSZTOF HABERKO, MIROSLAW BUĆKO, MARIA HABERKO,  
WŁODZIMIERZ MOZGAWA, ANNA PYDA, JERZY ZARĘBSKI

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY  
OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW, POLAND

### Abstract

*Natural origin hydroxyapatite (HAp) was extracted from the animal bones by their treatment with hot NaOH solution. Remaining organic matter oxidizes in air atmosphere at moderate temperatures. In the material of this kind carbonate groups and small amounts of magnesium were found, not present in the synthetic HAp. Fraction of carbonate groups decreases with temperature and also CaO appears, but structure of hydroxyapatite becomes preserved.*

### Introduction

Hydroxyapatite (HAp) with its high biocompatibility and good bioaffinity, stimulates osteoconduction and is slowly replaced by the host bone after implantation [1, 2]. From this point of view porous material fulfils better its role compared to the dense one. Two kinds of application of hydroxyapatite can be pointed out: i) as a porous material useful in bone surgery and ii) as an additive to organic polymers improving their biofunctionality.