

BADANIA HISTOPATOLOGICZNE ODCZYŃW TKANKOWYCH WOKÓŁ WSZCZEPU BIO-CERAMICZNEGO MATERIAŁU SZ2 OTRZYMANEGO METODĄ ZOL-ŻEL

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, ŁĄCZKA M.**,
CHOLEWA KOWALSKA K.**; ZIELIŃSKI K.***, KOKTYSZ R.***

*KLINIKA ORTOPEDII I ORTOPEDII DZIECIĘCEJ
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

**KATEDRA SZKŁA I EMALII

AKADEMII GÓRNICZO HUTNICZEJ W KRAKOWIE

***ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I CYTOBIOLOGII KLINICZNEJ WYDZIAŁU
WOJSKOWO-LEKARSKIEGO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

Celem pracy była ocena histopatologiczna procesów towarzyszących wypełnieniu doświadczalnie wytworzonego ubytku kostnego materiałem bioceramicznym Sz2 wyprodukowanym w Katedrze Emalii i Szkła Akademii Górniczo - Hutniczej w Krakowie. Do badań użyto bioszklę otrzymanego metodą zol - żel o składzie chemicznym: 80 %mol SiO₂; 4 %mol P₂O₅; 16 %mol CaO.

Materiał i metodyka

W badaniach doświadczalnych wykorzystano łącznie 87 królików rasy mieszanej o średniej wadze 3650 gramów (minimalna waga 3150 g, maksymalna 4200 g). Wszystkie króliki pochodziły z hodowli prowadzonej w Zwierzętarń Akademii Medycznej w Łodzi. Zaplanowane badania przeprowadzono w okresach obserwacji po 3, 6 i 12 tygodniach od daty wykonania operacyjnego ubytku kostnego i wypełnienia go odpowiednim materiałem.

Wszystkim królikom według własnej modyfikacji metody podanej przez Schmitta i Weeller w 1997 roku [6, 8] wykonywano ubytek kostny kości promieniowej przedramienia królika o wymiarach 20 mm x 5 mm x 5 mm. Ubytek kostny nie obejmował pełnej grubości kości, w dniu kości promieniowej pozostawiano listwę kostną o szerokości 3 do 4 mm, która łączyła brzozy wytworzonego ubytku kostnego dla międzyodłamowej stabilizacji wewnętrznej.

Obszar wytworzonego ubytku kostnego w prawym przedramieniu wypełniano bioszklą Sz2 w objętości ok. 0,5 cm³, a w lewym mrożonymi allogennymi przeszczepami kostnymi oznaczonymi literą P, królików w ilości ok. 0,5 g. W ubytek lewego przedramienia wszczepiano wcześniej przygotowane allogenne mrożone gąbczaste przeszczepy kostne P pobrane z dalszych nasad kości udowej i bliższych nasad kości piszczelowej. Przeszczepy kostne P przechowywano w jałowych buteleczkach w zamrażarce, w temperaturze -180 C przez 6 tygodni, po tym czasie implantowano je w wytworzony ubytek kostny przedramienia. Po 3, 6, 12, tygodniach od zabiegu operacyjnego króliki uśmiercano jednorazową dawką śmiertelną Vetbutalu.

Do badań histopatologicznych uzyskano od 1 do 3 przekrojów kostnych w płaszczyźnie prostopadłej do długiej osi kości grubości do około 3 mm każdy. Uzyskane wycinki tkankowe umieszczano w typowym roztworze odwapniającym będącym mieszaniną kwasów octowego i solnego oraz for-

EVOLUTION AND TYPE OF HISTOLOGICAL CHANGES IN THE AREA ADJESCENT TO IMPLANTED, ZOL-GEL DERIVED, CERAMIC SZ2 BIOMATERIAL

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, ŁĄCZKA M.**,
CHOLEWA KOWALSKA K.**; ZIELIŃSKI K.***, KOKTYSZ R.***

*KLINIKA ORTOPEDII I ORTOPEDII DZIECIĘCEJ
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

**KATEDRA SZKŁA I EMALII

AKADEMII GÓRNICZO HUTNICZEJ W KRAKOWIE

***ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I CYTOBIOLOGII KLINICZNEJ WYDZIAŁU
WOJSKOWO-LEKARSKIEGO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

The aim of the work was histopathological evaluation of the processes accompanying filling of experimentally created bone loss with bio-ceramic material Sz2 produced in the Chair of Enamel and Glass of the University of Science and Technology in Cracow. For experiments a zol-gel derived bio-glass with the following chemical composition: 80% mol SiO₂; 4% mol P₂O₅; 16% mol CaO was used.

Material and methods

For experiments total number of 87 rabbits of mixed breed were used. The rabbit's mean weight was 3650 grams (minimal weight - 3150 g, maximal - 4200 g). All rabbits came from one breed conducted by Medical Academy Zoo in Lodz. Planned experiments were carried out in four observation periods: 3, 6 and 12 weeks after the date of surgical performance of a bone loss and its filling with a proper material.

A 20 mm x 4 mm x 4 mm bone loss of radial bone from rabbit's forearm was performed according to our own modification of the method described by Schmit and Weeller in 1997 [6, 8]. The bone loss did not comprise the full thickness of a bone. On the bottom of a radial bone a 3 to 4 mm wide bone bar was left, and the bar connected edges of the bone loss in order to provide internal stabilisation.

The area of a bone loss in the right forearm was filled with approximately 0.5 cm³ of Sz2 bio-glass, and in the left forearm with approximately 0.5 g of frozen allogeneous rabbit bone transplants, marked with the letter "P". The bone loss of the left forearm was filled with an implant of previously prepared allogeneous frozen spongy bone transplants P taken from distal epiphysis of femoral bone and proximal epiphysis of tibial bone. Bone transplants P were stored in aseptic bottles in freezer, in -180 C for 6 weeks, and after this time they were implanted into created bone losses in forearms. After 3, 6 and 12 weeks after surgery the rabbits were sacrificed with one lethal dose of Vetbutal.

For the purpose of histopathology, 1 to 3 bone cross sections were obtained in the plane perpendicular to the long axis of the bone, each up to 3 mm thick. The obtained bone specimens were then placed in a typical decalcifying solution, a mixture of acetic, and hydrochloric acids, as well as formaldehyde; the duration of decalcification has been determined experimentally (based on a few pilot specimens) as 72 hours. After decalcification every specimen was neu-

maldehydu, czas odwapniania określono doświadczalnie (na podstawie kilku wycinków pilotażowych) na 72 godziny. Po odwapnieniu każdy z preparatów zubożniano a następnie przeprowadzano przez szereg alkoholi i ksylenów do parafiny. Z wykonanych bloczków parafinowych wykonywano następnie od 4 do 6 skrawków grubości 4-5 μm , na co najmniej 2 szkiełkach, które to skrawki następnie barwiono Hematoksyliną i Eozyną oraz metodą trójkromatyczną wg Massona. Każdy z wycinków oceniano w mikroskopie świetlnym.

Materiał histologiczny oceniany w tej części badań stanowiły również wycinki pochodzące z mięśni pośladkowych badanych zwierząt, w które wszczepiano badany materiał bioaktywny - poza etapem odwapniania, który nie był w tym wypadku konieczny, postępowanie z tymi wycinkami było identyczne jak opisane wyżej dla materiału kostnego. Na wybranych wycinkach z mięśni pośladkowych z wszczepionym biomateriałem wykonano dodatkowo barwienie ujawniające jony wapnia dla sprawdzenia ew. wapnienia w sąsiedztwie materiału ceramicznego.

Wyniki

W wycinkach pochodzących z pierwszego okresu obserwacji, po 3 tygodniach od daty zabiegu operacyjnego, stwierdzano najczęściej wokół drobin materiału ceramicznego zmiany odczynowe o różnym nasileniu - od niewielkiego włóknienia z niezbyt nasilonym odczynem zapalnym monocytarnym z domieszką makrofagów aż do rozległych odczynów zbudowanych z wiotkiej tkanki łącznej z licznymi makrofagami i niewielką ilością komórek wielojądrowych typu około ciała obcego. Załedwie w 1 przypadku stwierdzono obecność odczynów granulocytarnych typu ropnia tworzącego się wokół zgrupowania fragmentów materiału ceramicznego. Dość charakterystycznym znaleziskiem w tej grupie preparatów były różnej wielkości konglomeraty drobin materiału ceramicznego leżące w luźnej tkance łącznej i otoczone wąskim pasem odczynów komórkowych głównie limfocytarnych - obszary te sprawiały wrażenie jakby większe drobin szkła uległy separacji i rozpadowi na mniejsze nieregularne ziarna. W kilku przypadkach stwierdzono nawet obrazy "wnikania" pasm tkanki łącznej i nacieku limfocytarnego w obręb dużych ziaren biomateriału. Ten dość charakterystyczny obraz można jak się wydaje, tłumaczyć strukturą drobin materiału ceramicznego zbudowanego się z twardej, słabo rozpuszczalnej krzemionki oraz otaczającej ją i tworzącej liczne przegrody otoczce "hydroksyapatytowej" podatniejszej na działanie biologicznych "rozpuszczalników" znajdujących się w tkance ziarninowej. Badanie mikroskopowe nie pozwala na pewne ustalenie składu i pochodzenia krzemionki i otoczki hydroksyapatytowej, ale ich barwność i układ mogą uzasadniać hipotezę o fosforowo-wapiennym pochodzeniu.

W grupie zwierząt badanych po 3 tygodniach od operacji obserwowano rozległe proliferacje beleczek kostnych i chrząstki tworzące niekiedy układy przypominające histologiczne struktury kostniaków gąbczastych czy kostniakochrzęstniaków (oczywiście bez cech rozrostu typowo nowotworowego!). Obserwacje mikroskopowe zdają się wskazywać na dwa źródła tworzenia kości: jednym z nich jest proliferacja kostniny kostnawej i ogniska metaplastji kostnej tkanki łącznej w sąsiedztwie pozostawionej kości (vide metodyka operacji) oraz pozostawionych fragmentów okostnej; drugim źródłem tworzenia się elementów kostnych w sąsiedztwie wszczepu jest kostnienie na podłożu chrzęstnym. W wielu z analizowanych preparatów tej grupy stwierdzano, obszary proliferacji, o różnym nasileniu, młodej chrząstki szkieletowej. Na ogół występowały one w sąsiedztwie

tralizacji, and passed through a series of alcohols, and xylens to paraffine. From the obtained paraffine blocks 4 to 6 sections, 4 5 μm thick, were made, at least on two slides which were then stained with Hematoxylin and Eosin, and the trichromatic Masson method. Each of the slides was initially evaluated in a light microscope. The histopathologic material, evaluated in this part of the study, also consisted of specimens obtained from the gluteal muscles of the studied animals. The muscles were also implanted with the studied bioactive material. Aside from the decalcification phase, which wasn't necessary in this case, the slide preparation procedure was the same, as in the case of the bone specimens (described above). On chosen specimens from the gluteal muscles with the implanted biomaterial, a calcium ions detection stain has also been performed, to check for possible calcification in the muscle area surrounding the ceramic material.

Results

In the specimens obtained in the first period of observation (animals killed after 3 weeks from the surgical procedure), around the implanted biomaterial particles reactive lesions of differing intensity from slight fibrosis with a mild inflammatory reaction, mostly monocyte with some macrophages, all the way to diffuse reactions made up of flaccid connective tissue with numerous macrophages and a small number of multinuclear cells of the "around foreign body" type. Only in one case a granulocyte reaction (abscess) at the implanted material particles grouping site was observed. Quite a characteristic finding in this group were different size conglomerates of ceramic material particles, found in the flaccid connective tissue, and surrounded by a narrow strip of cell mediated reaction, mainly lymphocytic these regions looked as if larger glass particles decomposed into small, irregular grains. In a few cases an occurrence of connective tissue penetration and lymphocyte infiltration into the larger grains of the biomaterial has been found. This rather typical picture can be explained by the structure of the ceramic material, composed of a hard (and hardly soluble) silica, surrounded by hydroxyapatite coat, forming many partitions in the silica. The hydroxyapatite is probably made up of calcium and phosphates the microscopic imaging doesn't allow to determine with certainty the exact chemical composition, but due to the nature of the obtained dyeing and structure the hypothesis of calcium phosphoric nature of the hydroxyapatite seems to be wellgrounded. Hydroxyapatite is also more susceptible to biological "solvents", present in the granulation tissue. The microscopic observations seem to point to two sources of bone formation : one is the proliferation of the temporary callus and the focal osseous metaplasia of the connective tissue in the area adjacent to the remaining bone (see the methodology of the operation), and the left over callus fragments. Second source of bone elements formation in the neighborhood of the implant is cartilage based ossification. In many of the analyzed specimens in this group, areas of varying intensity young hyaline cartilage proliferation have been found. Most of them have been found in the area adjacent to the left over bone fragment margins, and in the area of the forearm syndesmosis. The cartilage fields in their peripheral regions have shown pronounced, although differing in intensity, ossification and cartilage based new trabecules formation. The morphologic observations pertaining to the studied subgroup of animals can be summed up as follows: § at the ceramic implant site, around the implanted material grains, varying intensity irregular formations of inflammatory infiltration are formed, along with connective fibrous

brzegów pozostawionego fragmentu kostnego i w obszarach odpowiadających więzozrostowi łączącemu kości przedramienia. Pola chrzęstne wykazywały w częściach obwodowych wyraźnie zaznaczone, choć zmienne w swym nasileniu kostnienie i tworzenie nowych beleczek kostnych na podłożu chrzęstnym.

Reasumując obserwacje morfologiczne u zwierząt po 3 tygodniach od wszczęcia bioszklą stwierdzano:

§ w miejscu wszczęcia wokół ziaren materiału ceramicznego powstają nieregularne układy nacieku zapalnego o zmiennym nasileniu i pasma tkanki łącznej włóknistej;

§ jednocześnie rozpoczyna się proliferacja elementów kostnych pochodzących z pozostawionego fragmentu kostnego oraz okostnej;

§ opisanym wyżej zjawiskom towarzyszy metaplasja chrzęstna więzozrostu promieniowo-łokciowego, proliferacja elementów chrzęstnych i tworzenie się na bazie proliferującej chrząstki nowych beleczek kostnych

§ całość obserwowanego obrazu histologicznego ma charakter nieregularnej blizny chrzęstno-kostnej

Obraz histologiczny wycinków pochodzących od zwierząt uśmierconych po 6 tygodniach od daty zabiegu operacyjnego można określić jako wypadkową obrazów obserwowanych w pierwszym okresie obserwacji, (po 3 tyg.) i w okresie obserwacji po 12 tygodniach. Jednocześnie zmiany obserwowane w tej grupie były najbardziej niejednorodne - sprawiały wrażenie jakby stopień nasilenia kostnienia, odczynu zapalnego, włóknienia i tworzenia chrząstki stanowiły bardziej wypadkową właściwości osobniczych aniżeli stanowiły jakiś odrębny i charakterystyczny obraz tej fazy gojenia się kości po przeprowadzonym zabiegu. Dlatego też uznano za niecelowe szczegółowe opisywanie obrazów histologicznych stwierdzanych w tej grupie zwierząt.

Ocena histologiczna wycinków pobranych z przedramion zwierząt uśmierconych w 12 tygodni od zabiegu operacyjnego charakteryzuje się pewną niejednorodnością. Obrazem dominującym w tej grupie jest wytworzenie nieregularnej blizny kostnej z zaznaczonym odtwarzaniem usuniętej podczas zabiegu kości. Charakterystyczną cechą tej grupy preparatów jest obecność zrostu pomiędzy kością łokciową nieoperowaną i pozostawionym fragmentem kostnym kości promieniowej. Zrosty te najczęściej zbudowane są z gąbczastej nieregularnej i wiotkiej tkanki kostnej, w nielicznych przypadkach stwierdza się w obrębie tego układu beleczek kostnych istnienie rozległych obszarów łącznotkankowych (tkanki łącznej włóknistej) i czasami fragmentów pól chrzęstnych podobnych do opisanych w obserwacjach po 3 tygodniach od zabiegu. W miejscu usuniętego fragmentu kości odbudowuje się zarówno kość gąbczasta jak i zbita część korowa z wyraźnie nieregularnym układem kanałów Haversa. Odbudowa ta w części przypadków bywa niepełna obejmowała 2/3 obwodu kości lub sprawia wrażenie nadmiernej, (tworzy się nowa kość o 2 lub 3 kanałach szpikowych otoczonych zbitą kością korową). W sąsiedztwie odbudowywanych struktur kostnych stwierdza się pola tkanki łącznej włóknistej z "wtopionymi" w nią drobinami materiału ceramicznego, podobne drobiniki stwierdza się także w utkaniu odbudowanej kości.

Wszczępy materiału ceramicznego do mięśni pośladkowych

W grupie zwierząt poddanych ocenie po 3 tygodniach od dokonania wszczęcia materiału ceramicznego do mięśni pośladkowych stwierdzano obecność licznych ziaren szkła w mięśniach otoczonych, otorebkowanych wiotką tkanką łączną z obfitym naciekiem zapalnym zawierającym zarówno liczne komórki limfoidalne jak i makrofagi oraz ogni-

tissue strips

§ at the same time begins the proliferation of bone elements from the remaining bone fragment and the callus remaining at the site of operation;

§ the changes described above are accompanied by syn-desmosis' cartilage metaplasia, cartilage proliferation, and the new bone trabecules formation on the basis of proliferating cartilage;

§ the entire histological image has the form of an irregular chondro osseus scar.

The histologic picture of specimens from animals killed after 6 weeks from surgery may be described as a mean of images after 3 weeks and those after 12 weeks of observation. At the same time images observed in this group were most heterogeneous giving the impression, as if the degree of ossification, the intensity of inflammatory reaction, fibrosis, and cartilage formation were more dependent on individual traits, rather than being a definite, characteristic picture of this phase of bone healing after a surgical procedure. That is why the authors thought it pointless to describe in detail the histological images found in this study animal group. A comparison of descriptions, as well as the photographic documentation after 3 and 12 weeks of observation allows to extrapolate as to the character of changes in this observation group (after 6 weeks).

The histological evaluation of specimens taken from the forearms of animals killed after 12 weeks from surgery is somewhat heterogeneous. The dominating picture in this group is the formation of an irregular osseus scar with a remnant rebuilding of the bone excised during surgery. The characteristic trait of this specimen group is the presence of a union between non operated bone and the left over bone fragment.

These osseus unions are usually build from spongy irregular and flaccid bone tissue. In rare cases one can find among these bone trabecules the presence of wide-spread regions of connective tissue (fibrous connective tissue), and sometimes fragments of cartilage fields, resembling those described 3 weeks post surgery. At the place of the excised bone fragment the spongy bone, as well as the compact cortical bone is being rebuild, with a visibly irregular structure of the Havers' canals. This remodelling in some cases is incomplete (as if only 2/3 of the full circumference of the bone have been rebuild), or seems "overdone" (the new bone formed has 2 or 3 bone marrow canals, surrounded by compact cortical bone). In the neighborhood of the rebuild bone structures the fields of fibrous connective tissue are found, with implanted particles of ceramic material. Similiar particles can also be found within the rebuild bone.

Ceramic material implants into the gluteal muscles

In the animal group studied 3 weeks after the ceramic material implant, the presence of multiple grains encapsulated in flaccid connective tissue, with an abundant inflammatory infiltration, containing both numerous lymphoid cells, macrophages, as well as focal gatherings of epithelium like cells, has been found. No case of a pus formation has been observed, or a widespread reaction of the "around foreign body" type. The muscle in the vicinity of the implanted biomaterial grains had marked signs of degeneration, which, however, should be connected with surgical damage, rather than the type of the material implanted. In none of the observed cases focal chondroid metaplasia hasn't been observed, and/or the "de novo" formation of bone trabecules. Only in one case in this group small focal calcifications of the connective tissue surrounding the implanted ceramic material particles have been found.

The picture of the specimens obtained from study animals after 6 weeks post surgery was no different from the

ska komórek o wyglądzie komórek nabłonkowych. Nigdy nie stwierdzono przypadku odczynu ropnego czy rozbudowanego odczynu typu około ciała obcego. Zaznaczone cechy zwyrodnienia mięśnia w sąsiedztwie wszczepionych drobin materiału należy raczej wiązać z uszkodzeniem operacyjnym aniżeli rodzajem wszczepionego materiału. W żadnym z preparatów nie zaobserwowano ognisk metaplastyki chrzęstnej i/lub tworzenia de novo beleczek kostnych. Tylko w jednym przypadku tej grupy stwierdzono niewielkie ogniska wapienia tkanki łącznej otaczającej wszczepione drobiny materiału ceramicznego.

Obraz preparatów uzyskanych od zwierząt poddanych obserwacji 6 tygodniowej pokrywał się z opisami histopatologicznymi 3 tygodniowych obserwacji. W obu grupach występował rozplm tkanki łącznej włóknistej wokół drobin materiału ceramicznego.

Ale w preparatach z 6 tygodniową obserwacją naciek zapalny był o mniejszym nasileniu z tendencją do przewagi komórek o wyglądzie nabłonkowych i sporadycznie tworzenia charakterystycznych ziarniaków typu około ciała obcego.

Omówienie wyników

Większość badaczy zajmujących się problemem stosowania biomateriałów ceramicznych w wypełnianiu ubytków kostnych (np. Wheeler, Schmitt, Hakayawa, Kurashina [1, 3, 6, 8]) stwierdzało w sąsiedztwie przeszczepianych materiałów różnie nasilone procesy zapalno-naprawcze z rozmaicie nasilonymi procesami naprawy zupełnej. W większości przypadków obserwowano odbudowę kości od obwodu wprowadzanego do ustroju materiału przy czym w pojedynczych doniesieniach (np. Kurashina [3]) udowodniono osteoindukcyjne (osteoplastyczne) działanie wszczepianego materiału.

Pozostałe doniesienia raczej świadczą o działaniu osteokondukcyjnym - materiał wszczepiony stanowi "rusztowanie" dla procesów zapalno-naprawczych. Wheeler (8) w bada-

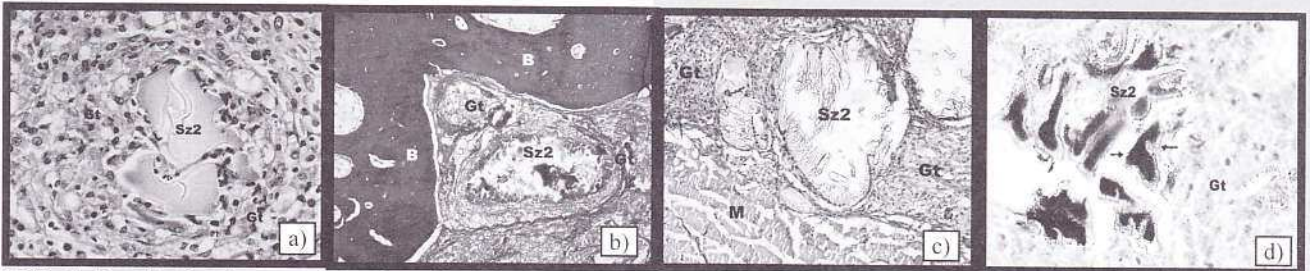
one described above. In this group the proliferation of the fibrous connective tissue has also been observed around the ceramic material particles. The inflammatory infiltration, if found, was of a lesser intensity than in the after 3 weeks group, and the predominant cells were epithelial like, and rarely the formation of typical "around the foreign body" granulomas has been observed.

Results discussion

Most of the investigators interested in problems of ceramic bio-materials usage for bone loss filling (e.g. Wheeler, Schmitt, Hakayawa, Kurashina [1, 3, 6, 8]) found variously intensified inflammatory-reparatory processes with various stages of complete repair processes in the area adjacent of the transplanted materials. In most of the cases bone reconstruction up to the perimeter of the implanted material was found, but in single reports (e.g. Kurashina [3]) a osteoinductive (osteoplastic) activity of the implanted material was shown. Other reports evidence rather about osteoconductive activity - the implanted material acts as a "scaffold" for inflammation-reparative processes.

Wheeler [8] in her fluorescence and polarised light microscopy studies showed after 4 weeks of observation a presence of rich-cellular inflammation infiltration and collagen fibres gathering and "adhering" around bio-glass granules. Formation of collagen fibres clusters around glass granules was higher after 8 weeks of observation. Basing on those observations she has formulated a conclusion that bio-glass granules serve as a matrix for collagen fibres and cellular infiltration that are precursors of bone formation.

Observations made by Schmitt [6] prove that bone "regrowth" in cases of bio-glass usage proceeds from the edges of the artificial loss. He has also found both bone re-creation and covering bio-glass granules with fibrous connective tissue and inflammation reaction, and kind of the observed reaction depended on the used material and on the level of its dispersion. Differences in behaviour of the mate-



RYS. 1. Przykłady obserwowanych zmian histopatologicznych - szczegółowy opis w tekście pracy.

a) Reakcja zapalna wokół ziarna bioceramiki po 3 tygodniach obserwacji - zwraca uwagę brak komórek olbrzymich wielojądrowych.

b) Tworzenie się kości zbitej w sąsiedztwie materiału bioceramicznego i tkanki ziarninowej

c) Biomateriał Sz2 wszczepiony do mięśnia poprzecznie prążkowanego - 3 tygodnie po implantacji.

d) Specyficzne barwienie ujawniające jony Ca^{2+} - w obszarze wszczepionego biomateriału Sz2 stwierdza się duże skupisko jonów wapnia. Nie stwierdzono obecności jonów wapnia w tkance ziarninowej otaczającej implantowany materiał.

(Sz2 - ziarna bioceramiki Sz2; Gt - tkanka ziarninowa; B - kość zbita w sąsiedztwie implantu; M - mięsień poprzecznie prążkowany)

FIG. 1. Samples of observed histological changes - detailed description in text.

a) Inflammatory reaction around bioceramic granule after 3 weeks of observation - note granulation tissue without large multinucleated cells.

b) Compact bone formation in neighbourhood of bioceramic material and granulation tissue.

c) Bioceramic material Sz2 implanted into striated muscle - 3 weeks after implantation.

d) Ca^{2+} Specific stain - in the area of implanted Sz2 biomaterial large concentration of Ca^{2+} ions has been shown. There is no specific stain in surrounding granulation tissue

(Sz2 - Sz2 bioceramic granules; Gt - granulation tissue; B - compact bone in the implant area; M - striated muscle)

niach z użyciem mikroskopii fluoroscencyjnej i mikroskopu świetlnego ze światłem spolaryzowanym wykazała po 4 tygodniach obserwacji obecność bogatokomórkowego nacieku zapalnego oraz skupiania się i "przylegania" włókien kolagenowych wokół ziaren bioszklą. Powstawanie skupisk włókien kolagenowych wokół ziaren bioszklą było większe po 8 tygodniach obserwacji. Na podstawie tych obserwacji sformułowała wniosek, że ziarna bioszklą służą jako matryca dla włókien kolagenowych i nacieku komórkowego będących prekursorami formowania się kości.

Obserwacje poczynione przez Schmitt'a [6] dowodzą, że "odrastanie" kości w przypadkach zastosowania bioszklą następuje od brzegów wytworzonego ubytku, przy czym stwierdził zarówno odbudowę kości jak i otaczanie ziaren bioszklą tkanką łączną włóknistą i odczynem zapalnym a rodzaj obserwowanej reakcji zależał od zastosowanego materiału i stopnia jego dyspersji. Różnice w zachowaniu się testowanych przez Schmitta materiałów można jak się zdaje dość prosto wyjaśnić - "napelzające" w obszar ubytku komórki (głównie fibroblasty) są komórkami wielopotentyjnymi (Robbins) zdolnymi do różnicowania się w różnych kierunkach. Różnicowanie się komórek np. w kierunku osteocytów w znacznym stopniu indukowane jest właściwościami otoczenia tkankowego w jakim znalazła się komórka - tym samym w środowisku bioszklą będziemy obserwowali tendencje do powstawania "torebki" łącznotkankowej (fibroblasty staną się dojrzałymi fibrocytami produkującymi kolagen podczas gdy w otoczeniu zdemineralizowanej kości tkanki te będą się różnicowały w kierunku kostniny kostnej a następnie w pełni wykształconej kości zbitej (a przy odpowiednio długim czasie obserwacji - odtworzonej w pełni kości beleczkowej). Na obrzeżu wszczepionego materiału osteocyty będą "migrowały" po wytworzonym przez biomateriał rusztowaniu i odtwarzały strukturę kości początkowo tylko w ograniczonym do brzegu obszarze podczas gdy w częściach centralnych ubytku będzie dominować odczyn zapalny i włóknisty. Vogel [7] w badaniach na królikach wytwarzał w kłykcium kości udowej łożę do której implantował po 100mg trzech różnych modyfikacji bioszklą Hencha. Oceny histologiczne dokonywał w 1, 4 i 12 tygodniu. W obserwacjach 1 tygodniowych stwierdził rozrost tkanki ziarninowej z licznymi komórkami nacieku zapalnego i licznymi proliferującymi naczyniami włosowatymi jednakże ubogą w elementy włókniste. Na powierzchni wytworzonej łoży obserwowano obecność kości gąbczastej a w przestrzeniach międzykomórkowych potwierdzono znaczne wysycenia macierzy pozakomórkowej solami wapnia i fosforu. Po 4 tygodniach wykazał, oprócz znacznego zwiększenia się limfocytarnego nacieku zapalnego, wyraźną mineralizację tkanek miękkich obszaru wszczepu z tworzeniem się kości i odczynami obrzymiokomórkowymi typu około ciała obcego. W obszarach zastosowanego biomateriału stwierdzono obecność pęknięć i szczelin, które wypełniała proliferująca tkanka łączna.

Lin [4] w badaniach na królikach z wytworzona łożą kostną w kłykcium kości udowej po 2 tygodniach od implantacji bioszklą zauważył, że obszar wytworzonego ubytku kostnego wypełniony jest tkanką łączną.

Badania własne w znacznym stopniu potwierdzają opisane wyżej procesy zachodzące w sąsiedztwie i we wnętrzu obszaru wypełnionego bioszklą. Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że w przeprowadzonych badaniach polegających na wszczepieniu testowanego materiału w mięśnie królika nie stwierdzono bezpośredniego osteoindukcyjnego działania szkła Sz2. Natomiast w wytworzonej łożu kostnej materiał ten wykazywał znaczne właściwości osteokondukcyjne. Reakcje tkankowe w sąsiedztwie testowanego bioszklą nie odbiegały w zasadniczy sposób od tych

rials tested by Schmitt may be, as it seems, quite easily explained: cells "crawling" into the loss area (fibroblasts mainly) are multi-potential cells (Robbins) able to differentiate in various directions. Cells differentiation for example towards osteocytes is largely induced by properties of the tissue surroundings in which there is a cell - so in the bio-glass environment we will observe tendencies for connective tissue "capsule" formation (fibroblasts will become adult fibrocytes producing collagen) and in the environment of demineralised bone the tissue will differentiate towards callus, and subsequently towards fully developed compact bone (and with observation time long enough - fully recreated trabecular bone). On the edges of the implanted material osteocytes will "migrate" on a scaffold formed by the biomaterial and will re-create bone structure on a limited area adjacent to the edge at first, when in the central parts of the loss inflammation reaction and fibrous reaction will prevail. Vogel [7] in studies on rabbits created sites in femoral bone condyle. Into the site he implanted 100 mg of three different Hensch bio-glass modifications. Histological evaluation was made after 1, 4 and 12 weeks. In 1 week observations he found growth of granulation tissue with numerous cells of inflammation inflow and numerous proliferating capillary vessels, but low fibrous elements. On the surface of the site presence of trabecular bone was observed, and in intracellular spaces extracellular matrix was found largely saturated with calcium and phosphorus salts. After 4 weeks he showed clear mineralization of soft tissues of implant area with bone formation and gigantocellular reactions around the foreign body along with significant growth of limfocytic inflammation inflow. Within the areas of the bio-material usage existence of cracks and splits was found, and those cracks were filled with proliferating connective tissue.

Lin [4] in his studies on rabbits with created bone site in femoral bone condyle found after 2 weeks from implantation that the area of bone loss is filled with connective tissue.

Our own studies largely support the described above processes taking place in vicinity and inside the area filled with bio-glass. One should note, however, that in the studies involving implantation of the tested material into rabbit's muscles no direct osteoinductive action of Sz2 glass was found. In the created bone site the material showed, however, significant osteoinductive properties. Tissue reactions in the area adjacent to the tested bio-glass did not differ seriously from those observed by Ito, Lin and Vogl [4,7]. Mc Neill (5) used 5 different bio-materials implanted into the shaft of rabbit's femoral bone. After 4 weeks from the time of implantation in most of the groups he did not report inflammation inflow. In some cases, where inflammation inflow and reparative reaction were found there was also increased number of nuclei found in the gigantic cells and highly vacuolised cytoplasm. The cells showed more features of typical phagocytosing cells around the foreign body and features of macrophages than of osteoclasts. Generally, each of the used bio-glasses was surrounded by scaffold made of newly-formed trabecular bone of various thickness. In single examples granules of bio-glass were partially surrounded by loose connective tissue or granulation tissue containing gigantic cells of foreign body surroundings type.

Conclusions

As it appears from our own observations the Sz2 bio-ceramics used for the study shows biological properties similar to those of materials used elsewhere, and kind and character of the observed tissue reactions suggests a possibility of more wide usage of this material for filling bone losses.

poczynionych przez Ito, Lin i Vogl'a [2, 4, 7]. Mc Neill (5) stosowała 5 różnych biomateriałów wszczepionych w trzon kości udowej królika. Po 4 tygodniach od czasu wszczepienia biomateriału w większości grup nie stwierdzał nacieku zapalnego. W kilku przypadkach, gdzie stwierdzono nacieki zapalne i odczyny naprawcze stwierdzono także zwiększoną liczbę jąder w komórkach olbrzymich z wysoko zwakuolizowaną "piankową" cytoplazmą. Komórki te wykazywały cechy typowych komórek żernych typu około ciała obcego i makrofagów aniżeli osteoklastów. Ogólnie każde z użytych bioszkieł było otoczone przez rusztowanie nowo utworzonej kości blaszkowatej o różnej grubości, chociaż w izolowanych przykładach granule bioszkieł były częściowo otoczone przez luźną tkankę łączną lub ziarninową zawierającą komórki olbrzymie typu około ciała obcego.

Wnioski

Jak wynika z obserwacji własnych, zastosowana do badań bioceramika Sz2 wykazuje zbliżone właściwości biologiczne do materiałów stosowanych na świecie, a rodzaj i charakter obserwowanych odczynów tkankowych wskazuje na możliwość szerszego stosowania tego materiału w wypełnianiu ubytków kostnych.

BADANIA BIOMECHANICZNE NOWEJ GENERACJI CERAMIKI SZ2 JAKO MATERIAŁÓW KOŚCIOZASTĘPCZYCH STOSOWANYCH W WYPEŁNIENIU UBYTKÓW KOSTNYCH WYTWORZONYCH DOŚWIADCZALNIE

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, S. MAZURKIEWICZ.**,
ŁĄCZKA M.***, CHOLEWA-KOWALSKA K.***, KOKTYSZ R. ****

*KLINIKA ORTOPEDII I ORTOPEDII DZIECIĘCEJ
UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

**KATEDRA MECHANIKI DOŚWIADCZALNEJ I BIOMECHANIKI
POLITECHNIKI KRAKOWSKIEJ

*** KATEDRA SZKŁA I EMALII

AKADEMII GÓRNICZO HUTNICZEJ W KRAKOWIE

****ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I CYTOBIOLOGII KLINICZNEJ WYDZIAŁU
WOJSKOWO-LEKARSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

Wstęp

W nowoczesnej ortopedii i chirurgii urazowej używanie przeszczepów kostnych allogennyh stanowią cenną wartość w uzupełnianiu różnego rodzaju ubytków kostnych. W rozległych ubytkach kostnych zarówno autogenne jak i al-

Piśmiennictwo

References

- [1] Hayakawa T., Yoshinari M., Kiba H., Yamamoto H., Nemoto K., Jansen J.: Trabecular bone response to surface roughened and calcium phosphate (Ca-P) coated titanium implants. *Biomaterials*. 2002; 23: 1025-1031.
- [2] Ito G., Matsuda T., Inoue N., Kamegai T.: A histological comparison of the tissue interface of bioglass and silica glass. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987 Apr; 21 (4): 485 - 497.
- [3] Kurashina K., Kurita H., Wu Q., Ohtsuka., Kobayashi.: Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. *Biomaterials*. 2002;23:407-412.
- [4] Lin F. H., Lin C. C., Liu H.C., Huang Y. Y., Wang C. Y., Lu C. M.: Sintered Porous DP - bioactive glass and hydroxyapatite as bone substitute. *Biomaterials*. 1994; 15 (13): 1087-1099.
- [5] MacNeill S. R., Cobb C. M., Rapley J.W, Glaros AG, Spencer.: In vivo comparison of synthetic osseous graft materials. A preliminary study. *J. Clin. Periodontol.* 1999 Apr; 26 (4): 239 245.
- [6] Schmitt J. M., Buck D. C., Joh S. Lynch S. E., Holinger J. O.: Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical - sized defects. *J. Periodontol.* 1997; 68: 1043 - 1053.
- [7] Vogel M., Voight C., Gross U. M., Muller - Mai C. M.: In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials*. 2001 Feb; 22 (4): 357-62.
- [8] Wheeler D. L., Stokes K. E., Park H. M., Hollinger J. O.: Evaluation of particulate Bioglass in rabbit radius osteotomy model. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 35: 249-254.

THE STRENGTH TEST ANALYSIS WITH NEW GENERATION BIOCERAMICS SZ2 AS A BONE SUBSTITUTE OF BONE FILLED WITH EXPERIMENTAL BONE DEFECT

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, S. MAZURKIEWICZ.**,
ŁĄCZKA M.***, CHOLEWA-KOWALSKA K.***, KOKTYSZ R. ****

* CLINIC OF ORTHOPAEDICS, AND CHILD'S ORTHOPAEDICS,
MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ

** FACULTY OF EXPERIMENTAL MECHANICS AND BIOMECHANICS
OF THE INSTITUTE OF TECHNOLOGY CRACOV, POLAND

*** THE DEPARTMENT OF ENAMEL AND GLASS,
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOV

**** PATOMORPHOLOGY AND CYTOBIOLOGY CLINIC DEPARTMENT
OF MEDICINE-ARMY, MEDICAL UNIVERSITY OF LODZ

Introduction

In a modern orthopaedic and trauma surgery the use of bone allografts is of a great value. In the extensive bone loss both autogenic as well allogenic bone transplantation should be performed. The use of allogenic bone graft could