

# ŚREDNI STOPIEŃ SZAROŚCI - OBIEKTYWNY PARAMETR BIODEGRADACJI WŁÓKIEN WĘGLOWYCH

KRZYSZTOF DĄBRÓWKA\*, JERZY NOŻYŃSKI\*\*, EWA ZEMBALA - NOŻYŃSKA\*, STANISŁAW BŁĄŻEWICZ\*\*\*

\*I KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH

\*\*FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII W ZABRZU

\*\*\*KATEDRA CERAMIKI SPECJALNEJ

AKADEMII GÓRNICZO - HUTNICZEJ W KRAKOWIE

## Streszczenie

Oceniano średnio stopień szarości odzwierciedlający gęstość optyczną włókien węglowych implantowanych królikom w okolice tkanki podśluzówkowej w I, II, III, IV, VI, VIII, XII i XVI tygodniu po zabiegu. Badania przeprowadzono wykorzystując system analizy obrazu mikroskopowego. Ocena statystyczna wybranego parametru wykazała cykliczne wahania wartości przeciętnej, mediany, wskazujące na naprzemienne zagęszczanie bądź rozluźnianie struktury włókien węglowych. Średni stopień szarości jest obiektywnym i użytecznym parametrem charakteryzującym biodegradację nici węglowej.

**Słowa kluczowe:** nić węglowa, średni stopień szarości, biodegradacja, analiza obrazu, patologia.

## Wprowadzenie

Zastosowanie węgla we współczesnej technologii materiałów organicznych, a następnie w medycynie rozpoczęło się po wyprodukowaniu form węgla obdarzonych elastycznością, zwłaszcza włókien węglowych produkowanych na drodze pirolizy. Badania nad wykorzystaniem węgla pirolitycznego, w postaci elastycznych włókien w medycynie prowadzono zarówno w USA, Francji i Wielkiej Brytanii [1]. W Polsce produkcję biomateriałów węglowych rozpoczęła Katedra Ceramiki Specjalnej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Nici węglowe i włóknina węglowa cechują się korzystnymi parametrami biologicznymi oraz wytrzymałościowymi wykazanymi w modelu doświadczalnego i klinicznego zespolenia złamań żuchwy [2,3,4,5,6,7]. Wykazano znaczną biozgodność, bioaktywność i biofunkcyjność pęczków nici węglowej [8].

W wyniku badań doświadczalnych zaobserwowano zjawisko biodegradacji materiałów węglowych. Pierwsze opisy tego zjawiska obejmowały ocenę morfologiczną oraz mikroskopią elektronową [2,3,9,10,11]. Szczegółowy mechanizm biodegradacji nie jest jeszcze poznany, stąd poszukiwania parametru cyfrowego, obiektywnie oddającego złożone zjawisko destrukcji inertnego biologicznie materiału. Celem badań było porównanie średniego stopnia szarości odzwierciedlającego gęstość optyczną włókien węglowych w różnych okresach biodegradacji.

## Materiał i metodyka

Materiałem badawczym były wycinki tkankowe pochodzące z 24 królików rasy mieszanej o masie ciała od 2500

# AVERAGE GREYNESS DEGREE - AS AN OBJECTIVE PARAMETER OF CARBON FIBRE BIODEGRADATION

3  
.....

KRZYSZTOF DĄBRÓWKA\*, JERZY NOŻYŃSKI\*\*, EWA ZEMBALA - NOŻYŃSKA\*, STANISŁAW BŁĄŻEWICZ\*\*\*

\*I KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W KATOWICACH

\*\*FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII W ZABRZU

\*\*\*KATEDRA CERAMIKI SPECJALNEJ

AKADEMII GÓRNICZO - HUTNICZEJ W KRAKOWIE

## Abstract

The mean level of greyness reflecting the optical density of carbon fibres implanted in the area of sub-mucosal tissue of rabbits was evaluated after week I, II, III, IV, VI, VIII, XII and XVI from the operation. The investigations were carried out with the aid of the microscopic image analysis. Statistical evaluation of the selected parameter revealed cyclic fluctuations of the mean value and the median, which indicated alternating thickening and loosening of the carbon fibre structure. The mean level of greyness is an objective and useful parameter that characterises the biodegradation of carbon suture.

**Key words:** carbon suture, mean level of greyness, biodegradation, image analysis, pathology

## Introduction

The application of carbon in the contemporary organic technology and later in medicine started after the development of flexible forms of carbon, especially carbon fibres produced by pyrolysis. The investigations concerning application of the pyrolytic carbon in the form of flexible fibres in medicine were undertaken in the U.S.A., France and Great Britain [1]. In Poland, manufacturing of carbon biomaterials was initiated at the Department of Special Ceramics, University of Mining and Metallurgy in Kraków. Carbon sutures and fabrics have advantageous biological and mechanical properties evidenced in the experimental and clinical model of mandible fracture uniting [2-7]. It has been shown that the carbon thread bundles exhibit good biocompatibility, bioactivity and biofunctionality [8].

The experimental studies allowed observation of the carbon fibre biodegradation. First descriptions of that phenomenon involved the morphological and microscopic evaluation [2,3,9-11]. The detailed mechanism of biodegradation has not been recognised so far and therefore the research is continued in order to find a digital parameter that would objectively evaluate the complex destruction process of the biologically inert material. The aim of this work was to compare the mean level of greyness, reflecting the optical density of carbon fibres at different biodegradation stages.

## Materials and methods

The experimental material comprised tissue specimens resected from 24 rabbits of mixed breed and weight of 2500 - 3500 g. In general anaesthesia, the carbon sutures

do 3500 g, którym w znieczuleniu ogólnym zakładano szew chirurgiczny na granicy tkanki podskórnej, mięśni i tkanki łącznej podśluzówkowej nicią węglową nr 4 wyprodukowaną przez Katedrę Ceramiki Specjalnej Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Ranę zamykano na głucho szwem chirurgicznym Ethicon. Zwierzęta poddawano eutanazji w znieczuleniu ogólnym po I, II, III, IV, VI, VIII, XII, XVI tygodniu od przeprowadzenia zabiegu. Okolicę rany chirurgicznej wycinano i utrwalało w 10% zbufoowanej formalinie. Tkankę poddawano rutynowej obróbce histopatologicznej zatapiając ją w parafinie. Skrawki o grubości 6  $\mu\text{m}$  barwiono hematoksyliną i eozyną. Ocenę średniej szarości, gęstości optycznej nici węglowych widocznych pod powiększeniem mikroskopowym 500x przeprowadzono wykorzystując system analizy obrazu Quantimet Color Option Wykrycie (detekcję) włókien węglowych prowadzono wykorzystując funkcję "Auto-detect", uwidaczniającą jedynie najbardziej zróżnicowane elementy obrazu. Średni stopień szarości odzwierciedlał gęstość optyczną. Kalibrację prowadzono z założeniem, że ciało idealnie czarne (drobiny grafitu lub sadzy), nieprzepuszczalne dla światła posiada wartość szarości równą 0, zaś ciało idealnie przepuszczalne (szkiełko podstawowe lub niezabarwione tło preparatu) - 256. W przypadku struktur węglowych szarość 0 odpowiada więc grafitowi lub drobinom węgla, zaś pośrednie stopnie szarości większe od 0 wskazują na rozluźnienie struktury węglowej.

Analiza statystyczna wyników badań obejmowała:

1. określenie zgodności rozkładu wartości morfometrycznej z rozkładem normalnym testem Liliefors [12,13],
2. obliczenie statystyki opisowej danego parametru dla poszczególnego okresu obserwacji czyli tygodnia od zabiegu; zakładając wstępnie typową dla danych morfometrycznych niezgodność z rozkładem normalnym nie podawano wartości błędu standardowego co zastąpiono wartością 25 percentyla (kwartyla dolnego) i 75 percentyla (kwartyla górnego).
3. porównanie pomiędzy sobą kolejnych tygodni z zastosowaniem testów stosownych do stwierdzonego rozkładu wartości (testów nieparametrycznych przy niezgodności rozkładu badanego z rozkładem normalnym lub parametrycznych przy zgodności rozkładów). Za testy nieparametryczne przydatne w ocenie przyjęto test Kruskala-Wallis (nieparametryczna ANOVA), test mediany, test Manna-Whitneya. Za wyniki statystycznie znamienne przyjęto wyniki o prawdopodobieństwie  $p < 0.05$ .

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o oprogramowanie statystyczne SPSS for Windows. Wyniki zestawiono tabelarycznie i przedstawiono graficznie.

## Wyniki

Przeanalizowano 72 preparaty histopatologiczne tkanek miękkich okolicy szwu z zastosowaniem nici węglowej pochodzących od 24 królików, w tym analizowano morfometrycznie 8691 fragmentów włókien węglowych.

W trakcie oceny kolejnych preparatów stwierdzono w 2 i 3 tygodniu obserwacji tworzenie przez włókna węglowe skupiska krótkich fragmentów, drobin grafitu oraz odcinkowe przejaśnienia włókien (RYS. 1). W szóstym tygodniu obserwacji stwierdzano obecność skupisk drobnych fragmentów nici węglowej, oraz nieregularnych drobin węgla o kształcie okrągłym lub owalnym (RYS. 2). W 12 i 16 tygodniu obserwacji w miejscu szwu znajdowano drobiny węgla niejednokrotnie wewnątrz komórek fagocytycznych (RYS. 3). Zmiany średniego stopnia szarości zilustrowano w TABLE 1. Rozkłady wartości średniego stopnia szarości badanego testem Liliefors nie wykazały zgodności z rozkładem normalnym ( $p < 0.01$ ). Skośność określająca symetrię rozkładu wahała się od wartości -1.4017 (XII tydzień obserwacji)

no. 4 (produced at the Department of Special Ceramics, University of Mining and Metallurgy in Kraków) were placed at the boundary between the subcutaneous tissue, muscles and connective submucosal tissue. The wound was closed with surgical sutures Ethicon. The animals were subjected to euthanasia in general anaesthesia after week I, II, III, IV, VI, VIII, XII and XVI from the operation. The area of wound was resected and fixed in a 10% buffered formalin. The tissue was given a routine histopathological treatment after being mounted in paraffin. The 6mm-sections were stained with hematoxylin and eosin. The mean greyness level and thereby optical density of carbon thread, observed at the magnification of 500x, was evaluated with the aid of image analysis system Quantimet Color Option. The carbon fibres were detected by means of the "Auto-detect" function, which reveals exclusively the most differentiated elements of the image. The mean level of greyness reflected optical density. The calibration was made with the assumption that the black body (e.g. graphite or carbon black particles), has the greyness value of zero, and that the totally transparent body (microscopic cover glass or unstained background of the specimen) - the value of 256. In the case of carbon structures the greyness value zero corresponds to graphite or carbon particles while the greyness values higher than zero indicate loosening of the carbon structure.

The statistical analysis comprised:

1. goodness of fit of the morphometric value distribution with the normal distribution by means of the Liliefors test [12,13].
2. calculation of the descriptive statistics of a given parameter at different observation periods, i.e. weeks from operation; having assumed a typical deviation of the morphometric data from the normal distribution, we have not quoted the values of standard error but the value of 25 percentile (lower quartile) and that of 75 percentile (upper quartile).
3. comparison of consecutive weeks of the experiment by means of tests suitable for the stated distribution (non-parametric tests when the examined distribution was not consistent with the normal distribution and the parametric ones when the distributions were consistent). The non-parametric tests used in this study were the Kruskal-Wallis test (the non-parametric ANOVA), the median test, and the Mann-Whitney test. It has been assumed that the statistically significant results were those with the probability  $p < 0.05$ .

The statistical analysis was carried out on the basis of software SPSS for Windows. The results are collected in Tables.

## Results

Analysed were 72 histopathological specimens of soft tissues from the vicinity of carbon-thread suture of 24 rabbits; the morphometric analysis comprised 8691 segments of carbon fibres.

After the second and third week of the experiment it has been stated that carbon fibres formed agglomerates of short segments and graphite particles and that locally some faded fibres appeared (FIG. 1). After six weeks the agglomerates of small segments of carbon thread were observed along with irregular, spherical or oval, carbon particles (FIG. 2). After twelve and sixteen weeks in the area of suture there were found carbon particles placed inside the phagocytising cells. (FIG. 3). The variations of the average degree of greyness are presented in TABLE 1. The distributions of the average greyness degree examined with the Liliefors test were not consistent with the normal distribution ( $p < 0.01$ ). The skewness, characterising the symmetry of distribution, ranged from -1.4017 (XII week of experiment) to 5.5794 (II week of experiment); zero value being typi-



RYS. 1. Skupiska włókien węglowych oraz drobin grafitu z odcinkowymi brzeżnymi przejaśnieniami włókien. Drugi tydzień obserwacji (H&E, 250x).

FIG. 1. Agglomerates of carbon fibres and graphite particles with locally faded edges. Week II (H&E, 250x).

RYS. 2. Obecność skupisk drobnych fragmentów nici węglowej oraz nieregularnych drobin węgla o kształcie okrągłym lub owalnym. Szósty tydzień obserwacji (H&E, 250x).

FIG. 2. Agglomerates of fine segments of carbon thread and irregular particles of carbon, having spherical or oval shapes. Week VI (H&E, 250x).

RYS. 3. Drobinny węgla w istocie pozakomórkowej oraz wewnątrz komórek fagocytujących (H&E, 250 x).

FIG. 3. Carbon particles in the intercellular substance and inside the phagocytising cells (H&E, 250x).

|   | Tydzień obserwacji / week of observations |          |          |          |          |          |          |          |
|---|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | I   | II       | III      | IV       | VI       | VIII     | XII      | XVI      |
| Liczba pomiarów<br>Number of measurements   | 981                                       | 599      | 1410     | 880      | 1068     | 1224     | 1305     | 1244     |
| Srednia<br>Mean value   | 68,1252                                   | 39,4453  | 38,6608  | 145,0001 | 41,3955  | 45,9913  | 158,4876 | 78,5324  |
| Mediana<br>Median   | 42,5                                      | 35,011   | 37,85    | 164,257  | 42,1315  | 46,625   | 166,666  | 46,5855  |
| Wartość najmniejsza<br>Minimum value  | 0   | 25,2     | 26,333   | 0        | 29,333   | 28       | 0        | 0        |
| Wartość największa<br>Maximum value   | 231,555                                   | 185,5    | 52,8     | 206,888  | 52,142   | 54,833   | 234      | 214,857  |
| 25 percentyl<br>25 percentile   | 34,05                                     | 33,494   | 34,492   | 121,611  | 37,518   | 42,4845  | 145      | 37,49    |
| 75 percentyl<br>75 percentile   | 90,718                                    | 38,416   | 42,543   | 179,5175 | 45,66    | 49,666   | 179,3905 | 107,448  |
| Skośność<br>Skewness  | 1,3052                                    | 5,5794   | 0,4083   | -0,9578  | -0,1601  | -0,5154  | -1,4017  | 0,9527   |
| Kurtoza<br>Kurtosis   | 0,4203                                    | 32,5443  | -0,6224  | 0,1134   | -0,8113  | 0,064    | 2,8205   | -0,7222  |
| Zgodność z rozkładem normalnym (t.Liliefors)<br>Godness of fit to the normal distribution | p < 0,01                                  | p < 0,01 | p < 0,01 | p < 0,01 | p < 0,01 | p < 0,01 | p < 0,01 | p < 0,01 |

TABELA 1. Średni stopień szarości włókien węglowych w poszczególnych tygodniach obserwacji.  
TABLE 1. Average greyness degree of carbon fibres in different observation periods.

do 5.5794 (II tydzień obserwacji), różniąc się od wartości 0, charakterystycznej dla rozkładu normalnego. Kurtoza określająca kierunek pochylenia rozkładu przyjmowała wartości tak dodatnie jak i ujemne.

Rozkład prawoskośny stwierdzano w I, II, IV, VIII i XII tygodniu obserwacji. Najmniejszą prawoskośność stwierdzano w VIII tygodniu obserwacji, największą zaś w II tygodniu (odpowiednio 0.064 i 32.5443). Rozkład lewoskośny obserwowano w III, VI i XVI tygodniu obserwacji. Najmniejszą lewoskośność stwierdzano w III tygodniu obserwacji, największą zaś w VI tygodniu (odpowiednio -0.6224 i -0.8113). Dynamika zmian kurtozy wskazuje na zmienną przewagę jaśniejszych bądź ciemniejszych włókien, zależnie od czasu obserwacji.

Wartość najmniejsza średniej szarości, 0 czyli idealna czerń stwierdzana jest w I, IV, XII i XVI tygodniu, w pozostałych tygodniach obserwacji wartość najmniejsza waha się pomiędzy 25.5 (II tydzień) a 29.333 (VI tydzień). Wartość największa wykazywała spadek od 231.555 w tygodniu I poprzez 185.5 w II tygodniu i 52.8 w III tygodniu, wzrost do 206.888 w IV tygodniu i spadek do 52.142 w VI w tygodniu, ponowny wzrost do 234 w XII tygodniu i nieznaczny spadek do 214.857 przy końcu obserwacji (XVI tydzień).

cal of normal distribution. The kurtosis that determines the direction of distribution asymmetry assumed both positive and negative values. The positive skewness was observed after week I, II, IV, VIII and XII. The smallest positive skewness was stated after week VIII, while the greatest one after week II (0.064 and 32.5443, respectively). The negative skewness was observed after week II, VI and XVI. The smallest negative skewness was stated after week III and the greatest one after week VI (-0.6224 and -0.8113). The dynamics of kurtosis variation indicates that the lighter or darker fibres were alternately the predominant ones, depending on the observation time.

The smallest value of the average greyness, i.e. zero, corresponding to the black body, was observed after week I, IV, XII and XVI, in the remaining cases it ranged from 25.5 (week II) to 29.333 (week VI). The highest value decreased from 231.555 in week I, through 185.5 in week II to 52.8 in week III, then it increased to 206.888 in week IV and decreased to 52.142 in week VI, then it increased again to 234 in week XII and slightly decreased to 214.857 in week XVI. The fluctuations of the highest and the lowest value result in significant fluctuations of the variation ranges in weeks I, IV, XII and XVI.

| Porównywane grupy<br>Compared groups               | Test Manna-Whitney'a<br>Mann-Whitney test | Test Kruskala-Wallis (ANOVA)<br>Kruskal-Wallis test (ANOVA) | Test mediany<br>Median test |
|--|---|---|-----------------------------|
| I tydzień : II tydzień<br>week I : week II         | $p < 0,001$                               | $p < 0,0001$  | $p < 0,0001$                |
| II tydzień : III tydzień<br>week II : week III     | $p < 0,0001$                              |   |                             |
| III tydzień : IV tydzień<br>week III : week IV     | $p < 0,0001$                              |   |                             |
| IV tydzień : VI tydzień<br>week IV : week VI       | $p < 0,0001$                              |   |                             |
| VI tydzień : VIII tydzień<br>week VI : week VIII   | $p < 0,0001$                              |   |                             |
| VIII tydzień : XII tydzień<br>week VIII : week XII | $p < 0,0001$                              |   |                             |
| XII tydzień : XVI tydzień<br>week XII : week XVI   | $p < 0,001$                               |   |                             |

**TABELA 2. Porównanie średniego stopnia szarości włókien węglowych w poszczególnych tygodniach obserwacji.**

**TABLE 2. Comparison of the mean greyness level of the carbon fibres in different observation periods.**

Wynikiem wahań wartości największej i najmniejszej są znaczne wahania zakresu zmienności w I, IV, XII i XVI tygodniu.

Wartość przeciętna średniej szarości (mediana) wykazywała spadek w II tygodniu (z 42.5 w I do 35.0110 wzrost w III i IV tygodniu (do 37.85 i aż 164.257) oraz spadek i wzrost w dalszych tygodniach (odpowiednio 42.1215 w VI, 46.625 w VIII i 166.666 w XII) i ponowny spadek w XVI tygodniu (46.5855).

Analiza statystyczna została zestawiona w TABELI 2. Test Kruskala-Wallis, test mediany jak i test Manna-Whitneya wskazują znamienne ( $P < 0.0001$ ) na zależność zmian wartości od czasu obserwacji.

Podsumowując wyniki obliczeń średniego stopnia szarości można stwierdzić, że

a. wyniki wartości najmniejszej wskazują na pojawienie się silnie skondensowanych fragmentów nici w I tygodniu oraz drobin węgla w XII i XVI tygodniu, odpowiadają więc w I tygodniu skondensowanej strukturze włókien analogicznej ze strukturą węgla, w kolejnych tygodniach zmianom struktury nici przy pojawianiu się czarnych drobin węgla w tygodniu IV, XII i XVI,

b. wahania wartości największej odpowiadają przejaśnieniu, zmianie struktury włókien węglowych odpowiadającej ich rozluźnieniu w IV i XII tygodniu,

c. wielkości przedziału ufności (odległość międzykwartylowa) wskazuje na stabilizację gęstości odzwierciedlanej poprzez jej gęstość optyczną w II tygodniu i największą zmianę w IV tygodniu. a na dużą dynamikę zmian obliczonej szerokości XVI tygodniu oraz pewną stabilizację w VI, VIII i XII tygodniu obserwacji,

d. analiza statystyczna ujawnia istotne statystycznie różnice średniego stopnia szarości pomiędzy badanymi tygodniami, jak również na znamiennej zależności średniego stopnia szarości od czasu obserwacji.

## Dyskusja

Wykorzystanie węgla w medycynie wiąże się z faktem występowania tego pierwiastka w różnej postaci, w tym węgla szkłopodobnego oraz turbostratycznego [14]. Klinicznie węgiel pirolityczny został wykorzystany w 1969 roku do pokrywania sztucznych zastawek serca [15,16], co znacznie zmniejszyło liczbę powikłań zakrzepowych. Syntetyczny węgiel otrzymywany drogą pirolizy wykorzystano celem modyfikacji powierzchni protez naczyniowych oraz implantów kontaktujących się z krwią i innymi rodzajami tkanki łącznej [17,18]. Istotną grupą biomateriałów węglowych wy-

The mean value of mean greyness (median) decreased in week II (from 42.5 in week I to 35.0110), increased in week II and IV (up to 37.85 and 164.257), decreased and increased again in the following weeks (42.1215 in week VI, 46.625 in week VIII and 166.666 in week XII) and finally decreased to 46.5855 in week XVI.

The results of statistical analysis are collected in TABLE 2. The Kruskal-Wallis test, the median test and the Mann-Whitney test indicate (at  $P < 0.0001$ ) that the analysed values depend on the observation time.

To sum up the obtained results the following statements can be formulated:

a. the smallest values indicate the presence of strongly condensed segments of carbon thread in week I and carbon particles in week XII and XVI, corresponding in week I to the condensed structure of fibres, analogous to that of carbon, in the following weeks to the changes of thread structure accompanying the appearance of black carbon particles (week IV, XII and XVI),

b. fluctuations of the highest value indicate fading and structural changes of carbon fibres that correspond to their loosening in week IV and XII,

c. range of confidence interval (interquartile distance) indicates stabilisation of density reflected in its optical density in week II and the greatest greatest in week VI, significant dynamics of changes of the calculated range in week XVI and certain stabilisation in week VI, VIII and XII.

d. revealed are statistically significant differences of the average greyness degree between the examined weeks, as well as significant dependence of the mean degree of greyness on the observation time.

## Discussion

The application of carbon in medicine is connected with the occurrence of this element in different forms, such as glass-like or turbostratic carbon [14]. The clinical applications started in 1969, from coating of the artificial valves with pyrolytic carbon [15,16], which remarkably decreased the number of thrombotic complications. The synthetic carbon received by pyrolysis was used in order to modify the surface of vessel prosthesis and of implants having a contact with blood and with other types of connective tissue [17,18]. An important group of carbon biomaterials used in dental surgery and in orthopaedics are screws, plates or nails made of carbon composites [19,20]. In spite of wide application of carbon thread and carbon composites

korzystywanych w chirurgii stomatologicznej jak i w ortopedii stanowią śruby, płytki, gwoździe wykonane z kompozytów węglowych [19,20]. Pomimo szerokiego wykorzystania nici węglowej czy kompozytów węglowych piśmiennictwo z zakresu biotolerancji tkankowej czy biodegradacji tych materiałów jest bardzo skąpe. Badania Jenkinsa i wsp. (21), implantujących włókna węglowe w miejsce doświadczalnego uszkodzenia ścięgien wykazały brak odrzucenia przez organizm owcy implantu oraz stopniowy rozpad włókien węglowych. Stewart i Watson (22) omawiając reakcje tkankowe na materiały węglowe, zwracają uwagę na skąpość oraz szybkie wygasanie nacieku zapalnego. Badania żywic poliakrylowych, prekursorów biomateriałów wykonanych z węgla turbostratycznego, używanych w stomatologii wykazały również, że wraz ze wzrostem temperatury polimeryzacji ujawniają się cechy ich pęcznienia, dostrzegalne zarówno w mikroskopie elektronowym skaningowym jak i w mikroskopie świetlnym [23]. W chwili obecnej nie wskazano jednak użytecznego i powtarzalnego parametru oceny biodegradacji nici czy włókien węglowej. Należy założyć, że szwy wykonane z nici węglowej będą ulegały wieloczynnikowej biodegradacji. Proces ten będzie sumą naprzemiennych naprężeń tkankowych przenoszonych na strukturę nici - szwu, zmęczenia materiału na skutek zginania, działania komórek żernych oraz biochemicznych zmian środowiska blizny. Niewątpliwie będzie dochodziło do pęknięcia i fragmentacji nici węglowej na krótsze fragmenty i być może pomiar długości poszczególnych odcinków nici znajdujących się w strukturze blizny mógłby dostarczyć informacji bezpośredniej, o skuteczności i trwałości szwu. Przesłanki do wykorzystania cyfrowej analizy obrazu wynikały ze wstępnych obserwacji morfologicznych, dokonywanych na materiale histopatologicznym w ustalonych przedziałach czasowych. Wstępnie oceniona zmienność szarości zilustrowana jako brzeżne czy naprzemiennie rozjaśnienia włókien węglowych zyskała odzwierciedlenie w ocenie cyfrowej gęstości optycznej, zilustrowanej jako średni stopień szarości. Dane cyfrowe mogą także wskazywać na niejednorodność nici węglowej, polegającej na zmiennej gęstości, co ulega znaczeniu wkrótce po implantacji nici, podczas działania zarówno sił mechanicznych jak i biologicznych procesów degradacyjnych. Obrazy mikroskopowe, wskazujące na zmienną barwliwość włókien węglowych powtarzają się w kolejnych tygodniach obserwacji, trzecim, czwartym, natomiast w tygodniu VI pojawiają się owalne drobiny resztek nici węglowej, odpowiadające drobinom grafitu. Biorąc pod uwagę spostrzeżenia zarówno wskazujące na pęcznienie polimerów [23], jak i obserwacji i pomiarów pojedynczych badanych włókien czy implantowanych struktur [3,11] należy wnieść o naprzemiennie występujących zmianach gęstości włókien węglowych, co można tłumaczyć bądź zwiększonym nasyceniem włókien płynami tkankowymi oraz następowym zagęszczaniem ich struktury, względnie zmianą konformacji struktur turbostratycznych tworzących nić lub włókno węglowe, ujawniającymi się podczas upływu czasu, czy biodegradacji. Powyżej opisane zjawisko nie zostało jednak skomentowane w dostępnym piśmiennictwie. Próba wyjaśnienia tak sformułowanej koncepcji stają się właśnie wyniki pomiaru gęstości optycznej włókien, przedstawione jako analiza średniego stopnia szarości. Każdy analizowany okres obserwacji posiada średni stopień szarości znamienne różniący się od pozostałych. Wartości średniego stopnia szarości odzwierciedlającego gęstość optyczną czyli pośrednio gęstość badanej struktury wskazują na nieznaczne zagęszczenie w II tygodniu, rozrzedzenie struktury nieznaczne w III oraz bardzo wyraźne w IV tygodniu, ponowne zagęszczenie w VI i VIII tygodniu, rozluźnienie struktury w XII i zagęszczenie w XVI tygodniu.

Całokształt powyżej opisanych wyników pomiarów przemawia za cykliczną biodegradacją włókien węglowych, prze-

there are not many data in the literature on tissue biotolerance or biodegradation of those materials. The investigations by Jenkins et al. [21], who implanted carbon fibres in the experimentally damaged tendons of a sheep, showed no rejection of the implant and gradual decomposition of the carbon fibres. Stewart and Watson [22], on discussing the tissue reactions on carbon materials, drew attention to small and rapidly disappearing inflammatory infiltration. The examination of polyacrylic resins as precursors of biomaterials prepared from turbostratic carbon, used in dental surgery, indicated also that with the increasing polymerisation temperature the symptoms of swelling became visible in both scanning electron microscope and in light microscope [23]. Up to now a useful and reproducible parameter enabling the evaluation of carbon thread or fibrin biodegradation has not been found. It should be assumed that the sutures made of carbon thread would undergo multifactorial biodegradation. This process would be a sum of alternating stresses transferred to the thread structure, fatigue of the material due to bending, activity of phagocytes and biochemical changes within the scar. Undoubtedly the carbon thread would undergo fracturing and fragmentation and maybe the measurement of thread segments in the scar area would give direct information on the effectiveness and durability of the suture. The idea of using the digital image analysis originated from the preliminary morphological observations of the histopathological specimens after fixed time intervals. The preliminary evaluation of greyness changes illustrated as edge fading or alternating fading of carbon fibres was reflected in the digital evaluation of optical density expressed as an mean greyness level. The digital values may also indicate the non-homogeneity of carbon thread, such as varying density, which is possible to observe soon after the implantation of the thread under the influence of mechanical and biological degradation processes. The microscopic images, indicating varying stainability of the carbon fibres are observed repeatedly in consecutive weeks of experiment: week II, IV but in week VI there appear oval particles of carbon thread remains, i.e. graphite. When the facts indicating polymer swelling [23] are taken into consideration together with the observations and measurements of single fibres or implanted structures [3,11] it becomes clear that carbon fibres undergo alternating changes in density. This can be explained by an increased saturation of fibres with the tissue fluids and sequential thickening of their structure or by a changing conformation of turbostratic structures making up the carbon thread or fibre, manifesting themselves with the passage of time or biodegradation progress. The above phenomenon has not been discussed in the literature. The results of optical density measurements and the analysis of mean level degree of greyness may be helpful in justifying the concept formulated above. Every observation period analysed is characteristic by the average degree of greyness, significantly different from others. The values of the average greyness degree, reflecting optical density and indirectly density of the examined structure, indicate slight thickening in week II and slight loosening in week III and remarkable loosening in week IV, then thickening in weeks VI and VIII, loosening in week XII and finally thickening in week XVI.

All of the obtained results testify to cyclic biodegradation of carbon fibres that involve repeated fibre density variations.

biegającą ze zmianami gęstości włókien, pojawiającą się naprzemiennie.

8

## Wnioski

Średnia szarość włókien węglowych odzwierciedlająca ich gęstość optyczną ulega cyklicznym wahaniom istotnie różniąc się w kolejnych okresach obserwacyjnych.

Średnia szarość włókien węglowych może być obiektywnym parametrem analizy obrazu opisującym proces ich biodegradacji.

## Piśmiennictwo

- [1] Benson J.: "Elemental carbon as a biomaterial". *J Biomed Mater Res Symp* 1971;2:41-7
- [2] Cieślik T., Pogorzelska-Stronczak B., Szczurek Z., Sabat D.: "Obserwacje nad wpływem włókniny węglowej na gojenie się tkanki kostnej w ubytkach pooperacyjnych wyrostków zębodołowych szczęk" *Materiały III Konferencji "Biomateriały Węglowe"* Ryto 1992, 23-28
- [3] Cieślik T.: "Płytki i śruby z kompozytu węgiel-węgiel do zespolenia odłamów żuchwy. Badania doświadczalne i kliniczne." *Rozprawa habilitacyjna*. Śl.A.M. Katowice 1993r.
- [4] Cieślik T., Pogorzelska-Stronczak B.: "Kilkuletnia ocena gojenia ubytków kości wyrostków zębodołowych w obecności włókniny węglowej" *Materiały VI Konferencji "Biomateriały Węglowe i Ceramiczne"*, Ryto 1995, 35-37
- [5] Cronin A.J., Llewelyn J., Hopkins R.: "Complications of use of carbon fibre in the temporomandibular joint: a case report." *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1992;30:186-9
- [6] Pogorzelska-Stronczak B., Skulski S., Cieślik T., Szczurek Z.: "Zastosowanie nici węglowych do szycia ran błony śluzowej oraz łączenia odłamów żuchwy. Badania doświadczalne" w: Kuś W.M. (red.): "Biomateriały w Medycynie" Drukarnia Agencji Poligraficzno-Wydawniczej KARNIOWICE, 1993, 228-231
- [7] Pogorzelska-Stronczak B., Szczurek Z., Cieślik T., Sabat D.: "Badania doświadczalne i kliniczne nad wpływem włókniny węglowej na gojenie ubytków kości szczęk" w: Kuś W.M. (red.): "Biomateriały w Medycynie" Drukarnia Agencji Poligraficzno-Wydawniczej KARNIOWICE, 1993, 232-235
- [8] Błażewicz M., Błażewicz S., Wajler C.: "Mechanical and implant behaviour of chemically modified carbon braids" *Ceramics Int* 1994;20:99-103
- [9] Cieślik T., Pogorzelska-Stronczak B., Szczurek Z., Skulski S., Sabat D.: "Technika skaningowa w ocenie płytek i śrub z kompozytu węgiel-węgiel stosowanych do zespolenia żuchwy" *Inż Mater* 1993;5:142-3
- [10] Pogorzelska-Stronczak B., Skulski S., Szczurek Z., Cieślik T.: "Ocena powierzchni nici węglowej umieszczonej w tkance kostnej żuchwy królików na podstawie badań w mikroskopie skaningowym" *Inż Mater* 1993;5:127-8

## Conclusions

Mean greyness of carbon fibres reflecting their optical density undergoes cyclic fluctuations, differing in consecutive observation periods. Mean greyness of carbon fibres can be used as an objective parameter of the image analysis to describe the biodegradation process.

## References

- [11] Skulski S.: "Ocena przydatności nici węglowej do zespolenia odłamów żuchwy na podstawie badań doświadczalnych" *rozprawa doktorska*, Śl.A.M. Zabrze 1993 r.
- [12] Siegel P.: "Nonparametric statistics". McGraw Hill New York 1957
- [13] SPSS v.6.0 for Windows. MANUAL. SPSS Inc. 1993.
- [14] Ismail I.M.K., Rodgers S.L.: "Comparison between fullerene and forms of well-known carbons. *Carbon* 1992;30:229-39
- [15] Borkos J.C.: "Carbon biomedical devices" *Carbon* 1977;15:355-71
- [16] Haubold A.D., Shim H.S., Bokros J.C.: "Carbon Biomedical devices" w: Williams D.F.(red): "Biocompatibility of clinical implant materials", vol.II, CRC Press, Boca Raton 1982
- [17] Bjork V.O.: "The pyrolytic carbon occluder for the Bjork-Shiley tilting disc valve prosthesis" *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1972;6:109-113
- [18] Louis J.P., Dabadie M.: "Fibrous carbon implants for the maintenance of bone volume after tooth avulsion. *Biomaterials* 1990;11:525-528
- [19] Jenkins G.M., Carvalho F.X.: "Biomedical applications of carbon fibre reinforced carbon in implanted prostheses". *Carbon* 1977;15:33-37
- [20] Prakash R., Marwah S., Goel S.C., Tuli S.M.: "Carbon fibre reinforced epoxy implants for bridging large osteoperiosteal gaps". *Biomaterials* 1988;9:198-202
- [21] Jenkins D.H.R., Forster I.W., McKibbin B., Ralis Z.A.: "Induction of tendon and ligament formation by carbon implant". *J Bone Joint Surg* 1977;59B:53
- [22] Stewart C.M., Watson R.E.: "Experimental oral foreign body reactions. Commonly employed dental materials". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990; 69:713-9
- [23] Vallittu PK; Ruyter IE; Nat R.: "The swelling phenomenon of acrylic resin polymer teeth at the interface with denture base polymers", *J.Prosthet.Dent.*, 1997; 78: 194-9