

OCENA WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNYCH KOMPOZYTÓW WĘGLOWYCH ORAZ WĘGIEL-ŻYWICA EPOKSYDOWA W OPARCIU O BADANIA DOŚWIADCZALNE NA KRÓLIKACH

Grzegorz Bajor*, Zbigniew Szczurek**, Daniel Sabat**

*Katedra i Oddział Kliniczny Chirurgii Dziecięcej Śląskiej Akademii Medycznej w Bytomiu

**Zakładu Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze

Streszczenie

Dokonano histopatologicznej oceny kompozytu węgiel-węgiel pokrytych pirowęgłem i hydroksyapatytem. Oceniono zachowanie się kompozytu węgiel-żywica epoksydowa w tkance kostnej królika. Do badań doświadczalnych użyto 24 młode króliki w okresie wzrostu kostnego. Okres obserwacji i prowadzenia doświadczenia wynosił pięć miesięcy. Oceniono histopatologicznie wpływ tych biomateriałów na procesy przebudowy kości. Przeprowadzone badania histopatologiczne wybranych narządów wewnętrznych nie wykazały zmian związanych z procesem degradacji wszczepionego materiału.

Słowa kluczowe: biomateriały, kompozyt węgiel-węgiel, kompozyt węgiel-żywica epoksydowa, pirowęgiel, hydroksyapatyt, badania doświadczalne.

Wstęp

Rozwój cywilizacji zdecydowanie wpłynął na wzrost liczby urazów obejmujących układ kostno-stawowy tak u dorosłych jak i u dzieci. Wśród dzieci dominują złamania kości niejednokrotnie wymagające interwencji chirurgicznej. Operacyjne leczenie złamań kości u dzieci wskazane jest znacznie rzadziej niż u dorosłych. Jednakże około 10-15% złamań wymaga operacyjnego zespolenia [8, 17, 22, 23, 24].

Do łączenia odłamów kostnych od chwili wprowadzenia tego sposobu leczenia, stosowano w większości różne elementy metalowe. W ostatnich latach najczęściej stosowaną metodą leczenia złamań kości jest stabilizacja wewnętrzna przy zastosowaniu metalowych elementów zespalających. Ujemną stroną tych materiałów jest występowanie tzw. metalozy czyli odczynu osteolitycznego wokół materiału zespalającego jak również tzw. zjawiska przesztynienia kości [1, 2, 8, 15, 22, 24]. Materiał zespalający nie powinien pozostawać na stałe w organizmie, zwłaszcza w okresie wzrostu kostnego. Taki stan wymaga powtórnego zabiegu chirurgicznego w celu usunięcia materiału z tkanki kostnej.

Zagrożenie dla biorcy wynikające ze stosowania organicznych materiałów kostnych liofilizowanych jak również metali i ich stopów pociągając za sobą potrzebę

EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF CARBON AND CARBON-EPOXY-RESIN COMPOSITES BASED ON EXPERIMENTS ON RABBITS

35

GRZEGORZ BAJOR*, ZBIGNIEW SZCZUREK**, DANIEL SABAT**

*DEPARTMENT OF CHILDREN SURGERY SILESIA MEDICAL ACADEMY IN BYTOM

**DEPARTMENT OF PATHOMORPHOLOGY SILESIA MEDICAL ACADEMY IN ZABRZE

Abstract

Histopathological evaluation of carbon-carbon composites coated with pyrocarbon and hydroxyapatite was performed. The behaviour of carbon-epoxy resin composite in the bone tissue of a rabbit was evaluated. 24 rabbits in their bone developmental period were used in the experiment. The observation period end the experiment itself lasted 5 months. The influence of these biomaterials on the processes of bone rebuilt was histopatologically evaluated. Histopathological examinations of chosen internal organs did not show any changes related to the process of degradation of the implant.

Key words: biomaterials, carbon-carbon composite, carbon-epoxy resin composite, pyrocarbon, hydroxyapatite, experiments

Introduction

The development of civilisation influenced the number of fractures related to osteoarticular system both in adults and in children. Bone fractures, which very often require surgical interventions are the most, frequent among them. Surgical treatment of bone fractures in children is advisable less frequently than in adults. However, approximately 10-15% of fractures requires surgical uniting [8, 17, 22, 23, 24].

Different metal elements were used in the majority of cases for uniting bone fragments until this method has been introduced. In the recent years internal stabilisation with metal uniting elements has been the most frequently used method in the treatment of bone fractures. However, the disadvantage of these materials is the occurrence of so called metalosis that is the osteolytic reaction around the uniting material which leads to overrigidity of bones [1, 2, 8, 15, 22, 24]. Uniting material shouldn't stay in the organism permanently especially in the period of bone growth. Such condition requires repeated surgical intervention in order to remove the material from the bone tissue.

The use of organic osseous lyophilised materials as well as metals and their alloys may be dangerous for the recipient since it requires the need for search and improvement of biomaterials already used in medicine [3, 4, 5, 7, 11, 25, 26]. Recent decades brought about the development of studies on biomaterials undergoing biodegradation. Materials pre-

poszukiwania, a także udoskonalania stosowanych już w praktyce biomateriałów [3, 4, 5, 7, 11, 25, 26]. Ostatnie dziesięciolecia przyniosły rozwój badań nad biomateriałami ulegającymi biodegradacji. Przedstawione materiały nie wymagają powtórnego zabiegu związanego z usuwaniem wykonywanych z nich elementów zespalających [4, 5, 6, 7, 10, 11]. Podążając za osiągnięciami w stosowaniu różnych typów biomateriałów w ortopedii dorosłych, chcielibyśmy poczynić obserwacje zachowania się i przydatności materiału węglowego w traumatologii dziecięcej.

Po uzyskaniu pozytywnych wyników badań doświadczalnych zostanie podjęta próba zastosowania kompozytu węglowego w chirurgicznym leczeniu złamań u dzieci.

Cel pracy badawczej:

1. Określenie reakcji organizmu rosnącego, w tym samej tkanki kostnej, na wszczep kompozytu węglowego.
2. Ocena skuteczności zastosowania grotów węglowych jako elementów zespalających odłamy kostne w doświadczeniach na królikach w okresie wzrostu.
3. Ocena wpływu pirowęgla i hydroksyapatytu jako dodatków do kompozytu węgiel-węgiel.
4. Ocena przydatności kompozytu węgiel-żywica epoksydowa do zespołów kostnych.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto 24 króliki rasy mieszanej w okresie wzrostu kostnego o wadze nie przekraczającej 2500 g. Zwierzęta podzielono na grupy w zależności od rodzaju implantowanego materiału węglowego.

I grupa:

sześć królików u których wszczepiono kompozyt węgiel-węgiel (2,4,14,18,20,22 tygodni obserwacji).

II grupa:

sześć królików z zastosowaniem kompozytu węgiel-węgiel bez pirowęgla, a HAp nałożono elektroforetycznie (2,4,14,18,20,22 tygodni obserwacji)

III grupa:

sześć królików z zastosowanym kompozytem węgiel-węgiel z warstwą pirowęgla (1,87 mg HAp/cm - 2 tygodnie obserwacji; 1,87 mg HAp/cm - 4 tygodnie obserwacji; 1,75 mg HAp/cm - 14 tygodni obserwacji; 2,03 mg HAp/cm - 18 tygodni obserwacji; 2,03 mg HAp/cm - 20 tygodni obserwacji; 1,87 mg HAp/cm - 22 tygodni obserwacji).

IV grupa:

sześć królików z zastosowaniem kompozytu włókno węglowe - osnowa epoksydowa pokrytego warstwą hydroksyapatytu (implant C-ep-Hap) (2, 4, 14, 18, 20, 22 tygodni obserwacji).

Króliki pochodziły z hodowli Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach i tam przebywały przez cały okres przeprowadzania eksperymentu. Pozostawały w oddzielnych klatkach w stale wietrzonem pomieszczeniu, w którym temperatura wynosiła 296-291 K. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta otrzymywały pełnowartościową, suchą, witalizowaną i mineralizowaną paszę. W okresie przed i pooperacyjnym nie podawano żadnych leków.

Zwierzęta operowano w warunkach jałowej sali operacyjnej. Znieczulenie przeprowadzano poprzez stały wlew kroplowy ketaminy rozcieńczonej w 0,9% NaCl. Po sprawdzeniu skuteczności znieczulenia zwierzęta przygotowywano do zabiegu operacyjnego poprzez wygolenie bocznej powierzchni uda z następowym myciem pola operacyjnego środkami odkażającymi. Skórę królika nacinano w osi długiej uda po uprzednim obłożeniu pola

sent do not require repeated surgery related to the removal of uniting elements [4, 5, 6, 7, 10, 11]. Following the achievements in the use of different types of biomaterials in adult orthopaedic surgery, we would like to make some observations concerning the usefulness and behaviour of carbon composite in children's traumatology.

After positive results have been obtained, an attempt of using carbon composite in surgical treatment of fractures in children will be undertaken.

The aim of the study:

1. Identification of growing organism reaction including bone tissue on carbon composite implant.
2. Evaluation of the use of carbon arrow heads as elements of uniting bone fragments in experiments on rabbits in the growing period.
3. Evaluation of influence of pyrocarbon and hydroxyapatite as additives to carbon-carbon composite.
4. Evaluations of usefulness of carbon-epoxy resin composite in bone uniting.

Material and method

24 rabbits of mixed breed in the period of bone growth weighing 2500 g were used in the experiment. The animals were divided into groups according to the type of carbon implant.

Group I:

6 rabbits with carbon-carbon composite (2, 4, 14, 18, 20, 22 weeks of observation)

Group II:

6 rabbits with carbon-carbon composite without pyrocarbon; HAp applied electrophoretically (2, 4, 14, 18, 20, 22 weeks of observation)

Group III:

6 rabbits with carbon-carbon composite with the coat of pyrocarbon (1.87 mg HAp/cm - 2 weeks of observation; 1.87 mg HAp/cm - 4 weeks of observation; 1.75 mg HAp/cm - 14 weeks of observation; 2.03 mg HAp/cm - 18 weeks of observation; 2.03 mg HAp/cm - 20 weeks of observation; 1.87 mg HAp/cm - 22 weeks of observation)

Group IV:

6 rabbits with carbon fibre reinforced epoxy matrix composite coated with hydroxyapatite layer (C-ep-HAp implant), (2, 4, 14, 18, 20, 22 weeks of observation).

The rabbits came from the Central Animal Farm of Silesian Medical Academy in Katowice where they were kept during experiment. They stayed in separate cages permanently aired at temperature of 296-261 K. The animals were given dry, wholemeal fodder high in minerals and vitamins. No medicines were administered both in pre and postoperative period. Animals were operated on in sterile operating room. The anaesthesia was given through the infusion of ketamine diluted in the solution of 0.9% of NaCl. Then the lateral surface of the thigh was shaven and cleansed with disinfectants. The skin was incised in the longitudinal axis after having been covered with sterile squares. The femoral bone was reached through intertrabecular spaces. Periostenum was incised in bone axis and the bone itself was horizontally cut in one half of its length by the use of Olivetti hack-saw. Bone marrow was evacuated from the marrow cavity and carbon arrow head 0.4 cm diameter and 4 cm long was inserted into the lumen of the marrow canal to impact its ends in the spongy part at the metaphysis of upper and lower thigh. Then both ends of the bone met at the carbon arrow head. Periostenum and groups of muscles came closer covering in this way the site of bone cut. Subcutaneous tissue and skin were sutured with interrupted sutures. Postoperative wound was again sterilised and

operacyjnego jałowymi serwetami. Do kości udowej docierano poprzez przestrzenie międzypowięziowe. Nacinano okostną w osi kości, a samą kość udową przecinano poprzecznie w połowie jej długości piłką Olivetta. Z jamy szpikowej ewakuowano szpik kostny, a w światło kanału szpikowego wprowadzano grot węglowy o średnicy 0,4 cm i długości około 4 cm tak aby jego końce mogły się zaklinować w części gąbczastej przynasady górnej i dolnej uda. Następnie dokonywano zblżenia obydwu końców przeciętej kości na grotie węglowym. Okostną wraz z grupami mięśniowymi zblżano do siebie pokrywając w ten sposób miejsce przecięcia kości. Zakładano szwy zblżające tkankę podskórną i szwy pojedyncze na skórę. Ranę pooperacyjną ponownie odkażano i pokrywano jałowym opatrunkiem. Kończynę operowaną umieszczano w opatrunku gipsowym typu gorset biodrowy na okres 2 tygodni.

We wszystkich grupach po uśpieniu letalnym przeprowadzono sekcję oraz oględziny okolic operowanych. Skóra oraz mięśnie znajdujące się ponad miejscem dokonanej operacji kostnej były w pełni wygojone i bez cech stanu zapalnego. Tkanki znajdujące się bezpośrednio nad miejscem przecięcia kości i wprowadzonym grotom węglowym szczelnie przylegały do tej okolicy. Początkowo łatwo dawały się usuwać, ale w miarę upływu czasu przypominały wyglądem dojrzałą kość stając się bardzo ściśle przylegającą tkanką do właściwej kości.

Usunięte węglowe elementy poddano ocenie fizykochemicznej w Katedrze Ceramiki Specjalnej Akademii Górniczo-Hutniczej. Ocenę histopatologiczną przeprowadzono w Zakładzie Patomorfologii Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrzu. Badania oparto na obserwacjach klinicznych oraz histopatologicznych w 2, 4, 14, 18, 20, 22 tygodniu doświadczenia.

Obserwacje kliniczne i posekcyjne.

Zdecydowanie dla celów klinicznych najbardziej przydatnym z racji wytrzymałości na odkształcenia jest materiał wykonany z kompozytu węgiel-żywica epoksydowa. Materiał pozyskany sekcyjnie po 2 tygodniach przebywania w kości makroskopowo nie wykazywał istotnych zmian wokół samej szczeliny złamania. Po 4 tygodniach obserwacji w kości stwierdzono słaby odczyn okostnowy, po 14-18 tygodniach słabą przebudowę i mineralizację kostniny, natomiast po 22 tygodniach obserwacji bardzo rozległą przebudowę otaczającej szczelinę złamania kostniny.

Przy zastosowaniu kompozytu węgiel-węgiel po 2 tygodniach obserwowano bardzo słaby bądź słaby odczyn kostniny. Także po 4 tygodniach obraz nie ulegał zasadniczej zmianie. W następnych tygodniach obserwacji tj. odpowiednio do czasokresu 14, 18, 22 tygodni stwierdzano narastanie odczynu okostnowego z wyraźną przebudową kostną.

W materiale węgiel-węgiel z warstwą pirowęgla stwierdzano makroskopowo opóźnienie pojawienia się procesów odczynu kostniny i przebudowy kostnej ale w 22 tygodniu był bardzo duży odczyn i przebudowa kostna.

W materiale węgiel-węgiel bez pirowęgla z HAP obserwowano bardzo dużą przebudowę kostną po 20-22 tygodniach obserwacji.

Zwierzęta od 4 tygodnia po operacji sprawnie posługiwały się operowaną kończyną. Należy jednak podkreślić złe tolerowanie przez te zwierzęta doświadczalne zastosowanych ciężkich unieruchomień gipsowych, jak również zbyt długie ograniczanie ruchów królika. Najczęstszą reakcją tego zwierzęcia na ograniczenie swobód była niechęć do przyjmowania pokarmów i wody, a także śmierć. Często zwierzęta wygryzały znaczną część opatrunku gipsowego zmniejszając w ten sposób jego ciężar.

dressed. The limb was put into plaster for 2 weeks.

In all groups autopsy and observation of operated regions were performed after lethal narcosis. Skin and muscles above the operated site were completely healed showing no inflammation. Tissues directly above the bone cut tightly adhered to this region. At the beginning they could be easily removed, however in the course of time they resembled mature bone thus becoming a tissue very well adhered to proper bone. The removed carbon elements underwent physicochemical evaluation in the Department of Special Ceramics University of Mining and Metallurgy. Histopathological evaluation was performed in the Department of Pathomorphology Silesian Medical Academy in Zabrze.

The study was based on clinical and histopathological observations in 2nd, 4th, 14th, 18th, 20th, 22nd week of observation.

Clinical and autopsy observations

It is obvious that for clinical reasons carbon-epoxy resin composite is the most suitable material because of its resistance to deformation. Material obtained in autopsy after having been placed in the bone for 2 weeks macroscopically showed no changes around fracture fissure. After four weeks of observation a slight periosteal reaction was observed in the bone. After 14 and 18 weeks slight rebuilt and mineralization of callus was observed and after 22 weeks extended rebuilt of surrounding fissure of callus fracture was noticed.

In carbon-carbon material covered with the layer of pyrocarbon the delay of periosteal reaction and bone rebuilt were noticed macroscopically and in 22nd week of observation the reaction and bone rebuilt were big.

In carbon-carbon composite without pyrocarbon with HAP big bone rebuilt was observed after 20-22 weeks of observation.

Animals used the operated limb very well after 4 weeks since surgery. It should be underlined, however, that they did not tolerate heavy plaster and limitation of their movements. The most frequent reaction was aversion to food and water, which in consequence lead to death. Often the animals bit fragments of plaster decreasing its weight in this way.

Macroscopic observations

Autopsy material in the form of the whole femoral bone was fixed in 10% of formalin and secured in specially labelled containers. Samples of soft tissues taken from chosen organs were also placed in formalin each one separately /lymph nodes, kidney, spleen, liver, lungs, brain/.

Samples of soft tissues and bones were fixed in 10% of neutralised solution of formalin. Some fragments of femoral bone tissue were decalcified electrolytically in Romeis fluid by the use of type PW 23 decalcification of bones. Further procedure was performed in a routine way and tissues were submerged in paraplast. The trochleas obtained were cut on microtome obtaining trochlea 6µ thick. After having been dewaxed they were stained with hematoxyline-eosin. Preparations obtained were evaluated under a light microscope using 40-400 times enlargement.

The material was prepared and histopathologically evaluated in the Department of Pathomorphology Silesian Medical academy in Zabrze.

Materiał sekcyjny w postaci całej kości udowej utrwalano w 10% formalinie i zabezpieczano w specjalnie oznakowanych pojemnikach. Materiał pochodzący z tkanek miękkich wybranych narządów królika umieszczano także w formalinie każdy z osobna (okoliczne węzły chłonne, wycinki z nerek, nadnerczy, wątroby, śledziony, płuc, mózgu).

Pobrane wycinki tkanek miękkich i kości utrwalano w 10% roztworze zubożonej formaliny. Fragmenty tkanki kostnej uda odwapniano elektrolitycznie w płynie Romeisa z wykorzystaniem odwapniania kości typu PW 23. Dalsze postępowanie przeprowadzono w sposób typowy i zatapiało tkanki w paraplastie. Otrzymane bloczki skrawano na mikrotomie uzyskując skrawki o grubości 6 m. Po odparafinowaniu skrawki barwiono rutynowo hematoksyliną - eozyną. Otrzymane preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym stosując powiększenia od 40-400 razy.

Przygotowania materiału oraz jego histopatologicznej oceny dokonano w Zakładzie Patomorfologii Wydziału Lekarskiego Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze.

Wyniki badań

Grupa 1

Kompozyt węgiel-węgiel (C-C)

Po 4 tygodniowej obserwacji w otoczeniu trzpienia kompozytu znaleziono złogi wszczepu węglowego złożonego ze zbrylonych fragmentów i zlokalizowane w szpiku kostnym. Na obwodzie pojawiła się młoda tkanka chrzęstna szklista, a na jej obrzeżu kość gąbczasta wykazująca jedynie ślady aktywności komórek osteoblastycznych. Na zewnątrz tych zmian kość gąbczasta była dojrzała, a w przestrzeniach międzybeleckowych pojawił się dojrzały szpik kostny.

Po 14 tygodniach trzpień otoczony był cienką kością zbitą, poza którą znajdowała się luźna tkanka łączna (RYS. 1). Dalej na obwodzie obecny był szpik kostny zawierający nieliczne zbrylone resztki węglowe i niewielkie beleczyki dojrzałej kości gąbczastej. Na zewnątrz tych zmian widoczna była dojrzała kość gąbczasta, w której tylko ogniskowo występowały zbrylone fragmenty wszczepu węglowego, zlokalizowane na powierzchni beleczek kostnych.

Po 18 tygodniach, w pobliżu trzpienia węglowego obserwowano beleczyki kości gąbczastej miejscowo obrzeżone osteoblastami. Przestrzenie międzybeleckowe wypełnione były włóknistą tkanką łączną ze śladami

Results of the study

Group 1

Carbon-carbon composite (C-C)

After a 4 week observation deposits of carbon implant composed of clumped fragments and localised in the bone marrow were found near the mandrel of the composite. New hyaline cartilage tissue was found on the periphery and on its edges spongy bone showing only some traces of osteoblastic cells activity. Outside these changes spongy bone was mature and in the intertrabecular spaces mature bone marrow occurred.

After 14 weeks mandrel was surrounded by a thin bone outside which loose connective tissue was seen (FIG. 1). Further on the periphery bone marrow containing clumped remains of carbon and some trabeculae of mature spongy bone were present. Outside mature spongy bone with focal clumped fragments of carbon implant localised on the surface of bone trabeculae was observed.

After 18 weeks, trabeculae of spongy bone locally edged by osteoblasts were observed around mandrel. Intertrabecular spaces were filled with fibrous connective tissue with some traces of carbon structures. Further on the periphery there was a thick-trabecular mature calcified spongy bone.

After 22 weeks thick-trabecular spongy bone covered with a layer of compact bone was present on the periphery of the implant.

Summing up

- A-4-period histopathological observation show normal or even slightly accelerated process of spongy bone rebuilt.
- It was accompanied by focal hyaline metaplasia continued as trabecular rebuilt.
- It seems obvious that 'pure' carbon composite influences the acceleration of bone rebuilt.

Group 2

Carbon-carbon composite without pyrocarbon. Hap applied electrophoretically.

In this group a composite mandrel without pyrocarbon covered with hydroxyapatite was implanted to the marrow cavity of a long bone of rabbits. The process of bone tissue restoration around the implant was the same as in the previous group in the following periods of observation:

After 22 weeks of observation the carbon mandrel was surrounded by mature compact bone in which fatty tissue of bone marrow was seen in the same places

RYS. 1. Kompozyt C-C.
Cienka warstwa kości zbitej otaczająca trzpień węglowy (H&E, 40x).

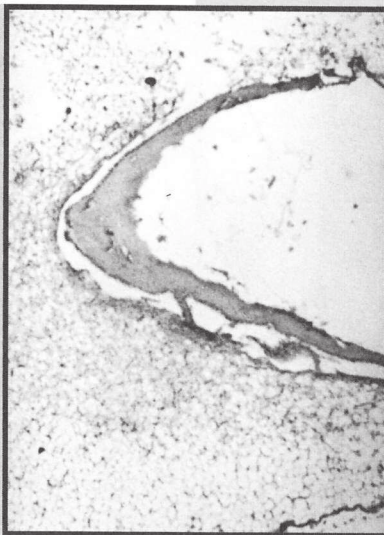


FIG. 1. Carbon-carbon composite.
Thin layer compact bone surrounding carbon mandrel (H&E, 40x).

RYS. 2. Kompozyt C-C bez pirowęgla. HAp nałożony elektroforetycznie. Młoda tkanka chrzęstna z fragmentami węgla oraz beleczki kostne otoczone niewielką ilością osteoblastów (H&E, 100x).

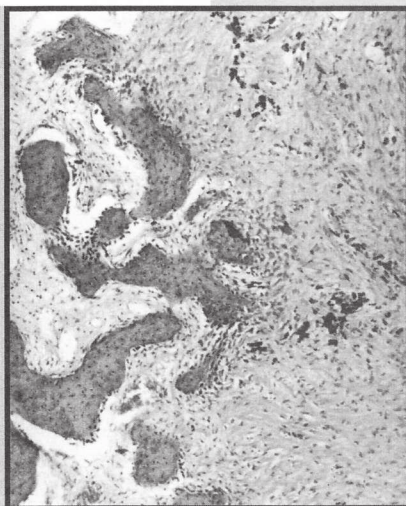


FIG. 2. Carbon-carbon composite without pyrocarbon. HAp applied electrophoretically. Young cartilage tissue with fragments of carbon and bone trabeculae surrounded by small amount of osteoblasts (H&E, 100x).

obecności nielicznych struktur węglowych. Dalej na obwodzie znajdowała się grubobeleczkowa dojrzała, uwapniona kość gąbczasta.

Po 22 tygodniach na obwodzie wszczepu występowała grubobeleczkowa dojrzała kość gąbczasta pokryta warstwą kości zbitej.

Podsumowanie.

- 4 okresowe obserwacje histopatologiczne wskazują na prawidłowy, a nawet znacznie przyspieszony proces odbudowy kości gąbczastej
- Towarzyszyła mu ogniskowa metaplazja chrzęstna przechodząca w odbudowę beleczek kostnych
- Wydaje się, że „czysty” kompozyt węglowy wpływa na przyspieszenie odnowy kości

Grupa 2

Kompozyt C-C bez pirowęgla. HAp nałożony elektroforetycznie

W grupie tej wszczepiono królikom do jamy szpikowej kości długiej trzpień kompozytowy bez pirowęgla pokryty nałożonym elektroforetycznie hydroksyapatytem. Proces odnowy tkanki kostnej wokół wszczepu przebiegał w poszczególnych okresach obserwacji podobnie jak w grupie poprzedniej.

Po 22 tygodniach obserwacji trzpień węglowy otaczała dojrzała kość zbita, w której miejscami widoczna była jeszcze tkanka tłuszczowa szpiku. Bardziej na zewnątrz trzpienia obserwowano młodą tkankę chrzęstną przekształcającą się w tkankę kostną. W tej ostatniej spostrzegano niewielką aktywność osteoblastów, które tylko miejscami pojawiały się na brzegu beleczek kostnych (RYS. 2). Podobne obrazy beleczek kostnych ze śladową aktywnością osteoblastyczną pojawiały się na tle luźnej tkanki łącznej zawierającej poszerzone naczynia krwionośne wypełnione erytrocytami. Miejscami okostna wykazywała metaplazję chrzęstną, przy czym chrząstka rozrastała się językowato w głąb kości. Głębiej kość gąbczasta była w pełni dojrzała bez aktywności komórkowej, a w przestrzeniach międzybeleczkowych pojawił się rozrost tkanki łącznej włóknistej zawierającej złogi wszczepionego węgla. Obecność złogów węgla w dojrzałych beleczkach kostnych obserwowano tylko sporadycznie.

Opisane powyżej złogi węgla wykazywały duży stopień zbrzylenia świadczący o zaawansowanej fazie biodegradacji. Ponadto tylko miejscami spostrzegano obecność dojrzałych beleczek kostnych w bogatokomórkowym szpiku. Morfologicznych wykładników obecności hydroksyapatytu nie znaleziono.

More to the outside of the mandrel a young hyaline cartilage tissue converting into bone tissue was observed. Minor activity of osteoblasts which occurred only in some places on the edges of trabeculae was noticed in the latter group (FIG.2). Similar pictures of bone trabeculae with traces of osteoblastic activity occurred in the background of loose connective tissue containing dilated blood vessels filled with erythrocytes. In some places peristonium showed cartilage metaplasia, however, cartilage extended into the bone. Deep inside spongy bone was fully mature showing no cellular activity and in the intertrabecular spaces extended growth of fibrous connective tissue containing deposits of implanted carbon occurred. The presence of carbon deposits in mature bone trabeculae was observed only sporadically.

Carbon deposits presented above showed high degree of clumping which proves advanced process of biodegradation. Moreover, the presence of mature bone trabeculae rich with cells bone marrow was observed only in some places. Morphological exponents of hydroxyapatite were not found.

Summing up

- Morphological observations show normal process of spongy bone rebuilt.
- Histological examinations also showed normal course of carbon implant biodegradation.

Group 3

Carbon-carbon composite coated with a layer of pyrocarbon.

In the group of animals with implanted composite mandrel with a layer of pyrocarbon the process of bone tissue rebuilt around the implant was similar to the previous groups.

After 14 weeks scattered deposits of carbon in the form of clumped focuses were observed nearby mandrel in both marrow and fatty tissues. Close to mature bone trabeculae showing no cellular activity, carbon deposits were very scarce.

After 22 weeks of observation only the presence of mature spongy bone was noticed outside the mandrel and intertrabecular spaces were constituted by fatty tissue (FIG.3). The influence of pyrocarbon additive on acceleration of bone reconstruction and morphological exponent of its presence in the tissues examined was not noticed.

Summing up

- 4-period -histopathological observations show normal and even accelerated process of spongy bone rebuilt.
- No influence of pyrocarbon on the course of bone restoration was noticed.

Podsumowanie

- Obserwacje morfologiczne wskazują na prawidłową odbudowę kości gąbczastej
- Badania histologiczne wykazały również prawidłowy przebieg biodegradacji wszczepu węglowego

Grupa 3

Kompozyt C-C z warstwą pirowęgla

W grupie zwierząt, którym wszczepiono trzpień kompozytowy z warstwą pirowęgla proces odnowy tkanki kostnej wokół wszczepu również przebiegał podobnie jak w poprzednich grupach.

Po 14 tygodniach obserwowano w pobliżu trzpienia w tkance szpikowej i tłuszczowej rozsiane złogi węgla w postaci zbrylonych ognisk. W pobliżu dojrzałych beleczek kostnych, nie wykazujących aktywności komórkowej, złogi węgla były bardzo skąpe.

Po 22 tygodniowej obserwacji zauważono poza trzpieniem jedynie obecność dojrzałej kości gąbczastej, a przestrzenie międzybeleczkowe stanowiła tkanka tłuszczowa (RYS. 3). Wpływu dodatku pirowęgla na szybkość procesu odnowy kości ani morfologicznych wykładników jego obecności w badanych tkankach nie stwierdzono.

RYS. 3. Kompozyt C-C z warstwą pirowęgla. Utkanie dojrzałej kości gąbczastej (H&E, 200x).

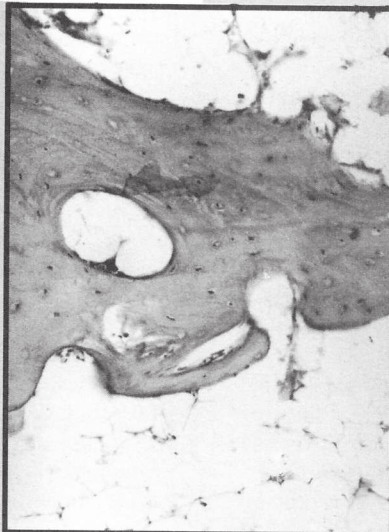


FIG. 3. Carbon-carbon composite with a layer of pyrocarbon. Weaving of mature spongy bone (H&E, 200x).

Podsumowanie

- 4 okresowe obserwacje histopatologiczne wskazują na prawidłowy, a nawet znacznie przyspieszony proces odbudowy kości gąbczastej
- Nie stwierdzono wpływu pirowęgla na przebieg odnowy kości.

Grupa 4

C-żywica epoksydowa, HAP nałożony elektroforetycznie

Po 4 tygodniach obserwacji znaleziono złogi węgla złożone wyłącznie z wyraźnie skróconych włókien inkrustujących chrząstkę szklaną w pobliżu trzpienia, która wykazywała cechy rozplywania się istoty podstawowej. Obecności żywicy epoksydowej nie znaleziono. Obecność chrząstki może wskazywać na metaplazję chrzęstną tkanki kostnej spotykaną często u zwierząt doświadczalnych.

W pobliżu trzpienia węglowego stwierdzono obecność kości gąbczastej z cechami resorpcji, o czym świadczyły nieliczne osteoklasty i pojedyncze fragmenty krótkich włókien węglowych.

Group 4

Carbon-epoxy resin, HAP applied electrophoretically.

After 4 weeks of observation deposits of carbon composed only of markedly shortened fibres incrustating hyaline cartilage and showing the features of diffuence of basic matter were found near the mandrel. Found no presence of epoxy resin. The presence of cartilage may show the metaplasia of the bone tissue often seen in animals.

The presence of spongy bone with features of resorption was shown around the carbon mandrel, which was proved by some osteoblasts and separate fragments of short carbon fibres.

After 14 weeks tiny oval bone trabecules in the process of reconstruction with the presence of osteoblasts strings covering bone trabecules were found in the close neighbourhood of carbon mandrel.

Numerous dilated blood vessels were filled with erythrocytes. On the edge of the structures described some tiny fragments of carbon were found.

On the periphery of the changes described thin trabeculae were fully shaped and only separate osteoblasts localised in a distance from the trabeculae showed unfinished process of resorption. Moreover, in many animals of this group mature calcified spongy bone localised in delicate loose connective tissue was detected. In other animals on the other hand, mature bone trabecules were found in rich

with cells bone marrow containing single megacariocytes. What is more numerous tiny capillaries filled with erythrocytes were found in this tissue.

Only in single animals rich deposits of markedly shortened carbon fibres forming clumped fragments were found on the surface of mature bone trabecules containing properly localised osteolytes. In both groups (3 and 14 weeks) no presence of epoxy resin was found, which may suggest a complete resorption of this substance which did not show either gigantocellular reaction or scary changes.

In the group of animals after 22 weeks of observation of carbon stem containing numerous bone trabecules containing osteocytes was found in the neighbourhood of carbon mandrel. Growing osteoblasts forming multilayered structures edged it. The trabecules of osteolyde had a tendency to merge and form fissure intertrabecular spaces with separate osteoblasts, which may suggest the unfinished process of resorption. In the close neighbourhood of bone trabecules there was a fibrous connective tissue of the periostenum containing remains of clumped carbon fibres suggesting highly developed biodegradation. In other places nearby active restoration of bone trabecules were only focuses of shortened carbon fibres. Carbon deposits were also observed in the fissures of the fibrous connective tis-

Po 14 tygodniach w najbliższym sąsiedztwie trzpienia węglowego znaleziono drobne owalne belecзки kostne w fazie żywej odbudowy z wyraźną obecnością sznurów osteoblastów pokrywających belecзки kostne. Dość liczne, poszerzone naczynia krwionośne wypełnione były krwinkami czerwonymi. Na brzegu opisywanych struktur znaleziono nieliczne drobne fragmenty węglowe.

Na obwodzie wyżej opisanych zmian cienkie belecзки kostne były w pełni ukształtowane i tylko pojedyncze osteoklasty zlokalizowane w pewnym oddaleniu od belecзки wskazywały na zakończony proces resorpcji. Ponadto u wielu zwierząt tej grupy stwierdzono utkanie dojrzałej uwapnionej kości gąbczastej zlokalizowanej w delikatnej luźnej tkance łącznej. U innych zwierząt natomiast dojrzałe belecзки kostne znajdowały się w bogatokomórkowym szpiku kostnym zawierającym pojedyncze megakariocyty. Ponadto w tkance tej spostrzegano liczne drobne naczynia włosowate wypełnione krwinkami czerwonymi.

Tylko u pojedynczych zwierząt znaleziono na powierzchni dojrzałych beleczek kostnych zawierających prawidłowo zlokalizowane osteocyty obfite złogi znacznie skróconych włókien węglowych tworzących zbrylone konglomeraty. W obydwu opisywanych grupach czasowych (3 i 14 tygodni) nie stwierdzono obecności żywicy epoksydowej, co może sugerować całkowitą resorpcję tej substancji, która również nie wywoływała odczynu olbrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych.

W grupie zwierząt po 22 tygodniach obserwacji, w najbliższym sąsiedztwie trzpienia węglowego utkanie złożone było z licznych beleczek kostnych zawierających osteocyty, obrzeżonych rozrastającymi się osteoblastami tworzącymi nawarstwiające się struktury. Belecзки osteoidu wykazywały tendencję do zlewania się z powstawaniem szczelinowatych przestrzeni międzybeleczkowych, w których występowały pojedyncze osteoklasty, co wskazywało na nie zakończony jeszcze proces resorpcji. W bezpośrednim sąsiedztwie beleczek kostnych znajdowała się tkanka łączna włóknista okostnej zawierająca nieliczne resztki zbrylonych włókien węglowych, świadczące o daleko posuniętej biodegradacji. W innych miejscach w pobliżu aktywnej odbudowy beleczek kostnych znajdowały się jedynie skupienia skróconych włókien węglowych. Złogi węglowe obserwowano również w szczelinach włóknistej tkanki łącznej okostnej, które wykazywały znaczniejszy stopień zbrylenia aż do pojawienia się struktur pyłowych. W tych miejscach występowały dość liczne poszerzone naczynia krwionośne wypełnione krwinkami czerwonymi. W jednym miejscu znaleziono jasnobrązową pozostałość po żywicy epoksydowej o charakterze homogenym, znajdująca się w grupie zbrylonych resztek włókien węglowych. W jej otoczeniu nie stwierdzono żadnego odczynu komórkowego typu "około ciała obcego" (RYS. 4).

sue of the periostenum which showed higher degree of clumping until dusty structures occurred. In these places numerous dilated blood vessels filled with erythrocytes were found. Light brown remains of epoxy resin of homogenic origin in the group of clumped remains of carbon fibres were found in one place. In its surrounding no cellular reaction of 'around foreign body' type was found (FIG.4).

In the group observed remains of carbon implant were found showing developed process of biodegradation in the character of clumped broken up structures. Only in some places in the intertreabecular spaces some fragments of markedly shortened carbon fibres were present. Further from the carbon mandrel mature spongy connective tissue formed having net-like structure in which there was no activity of bone cells.

Summing up

- In the course of experiment covering 4, 14, 18, 20, 22 weeks processes of resorption and restoration of the bone until mature spongy bone was formed were observed in bone marrow and the bones surrounding carbon mandrel.
- These changes were accompanied by developed biodegradation of the fragments of the implant until clumped structures were formed followed by dusty disintegration.
- Carbon fragments of the external parts of the mandrel influence spongy bone restoration.
- Only in the last group remains of epoxy resin with no gigantocellular reaction and scary changes were found.
- In the course of experiment the occurrence of metaplastic hyaline cartilage changing into bone was observed.
- The course of experiment shows progress in bone marrow restoration.

The examined internal organs (brain, lungs, kidney, liver, spleen, adrenal glands, lymph nodes) showed no changes related to the course of experiment.

Discussion

Processes of fibrous degradation of carbon materials are commonly known and often regarded as very positive [4,10,11,16,21]. However, according to some authors it is not known what happens to carbon particles which underwent degradation [2,3,25,26]. The results of histopathological examination of tissues and distant organs in our study explain the problem. In the experiments on rabbits Cieślak showed the presence of carbon particles in nearby lymph nodes, which can also be confirmed in our study. However, no traces of carbon in distant organs and tissues were found. Biodegradation of fibrous carbon materials was also confirmed in our experiment with carbon-carbon composite,

RYS. 4. Kompozyt C-żywica epoksydowa. HAp nałożony elektroforetycznie. Fragment żywicy epoksydowej i resztki zbrylonych włókien węglowych bez cech odczynów olbrzymiokomórkowych (H&E, 400x).

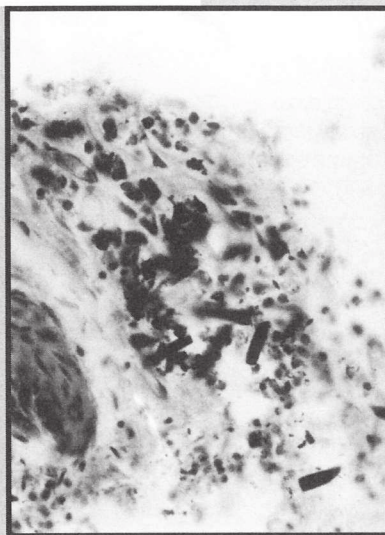


FIG. 4. Carbon-epoxy resin composite. HAp applied electrophoretically. Fragment of epoxy resin and remains of clumped carbon fibres with no features of gigantocellular reaction (H&E, 400x).

W obserwowanej grupie znaleziono niewielkie resztki obecności wszczepu kompozytu węglowego wykazujące daleko posunięty proces biodegradacji o charakterze zbrzylnych rozdrobnionych struktur. Tylko miejscami w utkaniu kości gąbczastej, w przestrzeniach międzybeleczkowych występowały nieliczne fragmenty znacznie skróconych włókien węglowych. W dalszej odległości od trzpienia węglowego wytworzyła się dojrzała gąbczasta tkanka kostna tworząca siatkowatą strukturę, w której nie spostrzegano aktywności komórek kostnych.

Podsumowanie

- W przebiegu doświadczenia obejmującego okresy obserwacyjne 4, 14, 18, 20, 22 tygodnie obserwowano w szpiku i kości otaczających trzpień węglowy procesy resorpcji, a następnie odbudowy kości aż do powstania dojrzałej kości gąbczastej.
- Powyższym przemianom towarzyszyła postępująca biodegradacja fragmentów wszczepu węglowego aż do powstania zbrzylnych struktur i ich pyłowego rozpadu.
- Fragmenty węglowe z części zewnętrznych trzpienia wpływają stymulująco na odnowę kości gąbczastej.
- Jedynie w ostatniej grupie znaleziono ślady obecności żywicy epoksydowej, nie wywołującej odczynu obrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych.
- W przebiegu doświadczenia obserwowano pojawienie się w szpiku kostnym obecności metaplastycznej chrząstki szklistej ulegającej kostnieniu.
- Przebieg doświadczenia wskazuje na postępującą odnowę szpiku kostnego

W badanych narządach wewnętrznych (mózg, płuca, nerki, wątroba, śledziona, nadnercza węzły chłonne) nie wykazano zmian związanych z przebiegiem doświadczenia.

Omówienie i dyskusja

Procesy degradacji włóknistych materiałów węglowych są zjawiskami ogólnie znanymi i najczęściej uważa się je za bardzo pozytywne [5, 10, 11, 16, 21]. Część autorów twierdzi jednak, że cecha ta nie zawsze jest korzystna [7, 12]. Nie do końca bowiem zostały wyjaśnione losy zdegradowanych i uprzętaných z miejsca ich wszczepienia drobin węglowych [2, 3, 25, 26]. Próbą wyjaśnienia tego problemu są nasze wyniki badań histologicznych tkanek i odległych narządów. W pracy doświadczalnej na królikach Cieślak wykazał obecność drobin węglowych w okolicznych węzłach chłonnych, co możemy potwierdzić naszymi badaniami. Natomiast nie odnaleźliśmy śladów węgla w odległych narządach i tkankach. Biodegradacja włóknistych materiałów węglowych została również potwierdzona w naszym doświadczeniu z kompozytem węgiel-węgiel, natomiast zdecydowanie spowolniona w obrębie kompozytu węgiel-żywica epoksydowa.

Obserwacje histologiczne w grupie doświadczalnej 1,2 i 3 wskazują na prawidłowy, a nawet znacznie przyspieszony proces odbudowy kości gąbczastej u młodych zwierząt. Wielu autorów próbowało wyjaśnić rolę kompozytu węglowego w procesach gojenia tkanki [3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15]. Jedni uważają, że wrastanie tkanki łącznej wzdłuż włókien węglowych jest związane z porowatą budową, inni nie wykluczają możliwości indukowania wzrostu tkanki łącznej w kontakcie z włóknem węglowym. Naszym zdaniem efekty te są spowodowane wyjściowym stanem powierzchni materiałów kompozytowych. Ich duża porowatość otwarta i tym samym duże rozwinięcie powierzchni sprzyja penetracji płynów ustrojowych co ułatwia procesy degradacji materiałów [3, 4, 25, 26]. Tego typu zmian będących wynikiem biodegradacji implantów nie

although markedly slower within carbon-epoxy resin composite.

Histopathological observations in the study groups 1, 2, 3 show normal or even markedly accelerated process of bone restoration in young animals. Many authors tried to explain the role of carbon composite in the process of tissue healing [3, 4, 5, 6, 10, 11, 13, 14, 15]. Some think that growing of connective tissue into carbon fibres is related to porous structure others consider the possibility of inducing tissue growth in contact with carbon fibres. In our opinion these effects are caused by the initial condition of surfaces of composite materials. Their big porous structure and in this way big development of surfaces is very likely to penetration of body fluids which enables for degradation processes of the material [3, 4, 25, 26]. These types of changes being the result of biodegradation of implants are not observed in case of carbon-epoxy resin composite, with HAP applied electrophoretically [4]. In this case processes of resorption close to the mandrel precede bone restoration until mature spongy bone is formed. These processes are accompanied by developed biodegradation where carbon fragments from the outer parts of the mandrel stimulated the processes of spongy bone restoration. However, the presence of epoxy resin did not caused gigantocellular reaction and scary changes.

Our observations show that carbon-carbon composite itself (group 1) positively influences the acceleration of young bone restoration. On the basis of own histological observations it is not possible to show significant influence of pyrocarbon additive on the speed of bone restoration. Morphological exponents of its presence were not found in the examined material. Positive influence of hydroxyapatite on the process of bone restoration was not confirmed in our study because we could not find any morphological exponents of its presence in the young bone tissue of a rabbit [9, 16, 18, 19, 20].

According to other authors it is to improve fixation of the implant in the bone thanks to faster bone integration. In our opinion, however, some authors overestimate biological properties of hydroxyapatite using it even in covering autogenic implants. Our observations while implanting carbon mandrel covered with hydroxyapatite show that it is very loosely tight with mandrel itself. It becomes more intense during contact of dump tissues with the environment. Thus this delicate layer may easily be removed from the surface while being implanted in the bone tissue as well as touched by surgical instruments.

Conclusion

1. 4-period histopathological observation show normal or even markedly accelerated process of spongy bone restoration.
2. It seems that pure carbon composite influences the acceleration of bone restoration in young animals.
3. No influence of hydroxyapatite and pyrocarbon on the process of bone restoration was found.
4. Stimulating influence of carbon on the restoration of spongy bone and lack of gigantocellular reactions on the presence of epoxy resin was found.

obserwuje się w przypadku kompozytu węgiel-żywica epoksydowa, HAp nałożony elektroforetycznie (grupa 4). W tym przypadku występują najpierw procesy resorpcji w sąsiedztwie trzpienia węglowego, a następnie odbudowa kości aż do powstania dojrzałej kości gąbczastej. Powyższym procesom towarzyszyła postępująca biodegradacja, gdzie fragmenty węglowe z części zewnętrznych trzpienia wpływały stymulująco na procesy odnowy kości gąbczastej. Jednak sama obecność żywicy epoksydowej nie wywoływała odczynu olbrzymiokomórkowego ani zmian bliznowatych.

Z naszych obserwacji wynika, że sam kompozyt węgiel-węgiel (grupa 1), wpływa najbardziej korzystnie na przyspieszenie odnowy młodej kości. W oparciu o własne obserwacje histologiczne nie można wykazać istotnego wpływu dodatku pirowęgla na szybkość procesu odnowy kości. Nie znaleziono także w badanym materiale morfologicznych wykładników jego obecności. Szeroko dyskutowany w piśmiennictwie pozytywny wpływ hydroksyapatytu na procesy odnowy kości nie znalazł także potwierdzenia w naszych badaniach, gdyż nie znaleźliśmy morfologicznych wykładników jego obecności w młodej tkance kostnej królika [16, 18, 19, 20]. Wg niektórych autorów ma on poprawiać umocowanie wszczepu w kości dzięki szybszej osteointegracji. Wydaje się nam, że jednak niektórzy autorzy przeceniają własności biologiczne hydroksyapatytu stosując go nawet do pokrywania przeszczepów autogennych. Z naszych obserwacji jakie poczyniliśmy podczas implantowania trzpienia węglowego pokrytego hydroksyapatytem wynika, że jest on bardzo luźno związany z samym trzpieniem. Nasila się to jeszcze bardziej w chwili kontaktu ze środowiskiem wilgotnych tkanek. Tak więc w trakcie umieszczania go w tkance kostnej, a nawet dotykania narzędziami chirurgicznymi łatwo może dojść do usunięcia tej delikatnej warstwy z powierzchni implantu.

Wnioski

1. 4 okresowe obserwacje histopatologiczne wskazują na prawidłowy, a nawet znacznie przyspieszony proces odbudowy kości gąbczastej.
2. Wydaje się że "czysty" kompozyt węglowy wpływa na przyspieszenie odnowy kości u młodych zwierząt.
3. Nie stwierdzono wpływu hydroksyapatytu i pirowęgla na przebieg odnowy kości.
4. Stwierdzono stymulujący wpływ węgla na odnowę kości gąbczastej oraz brak odczynu olbrzymiokomórkowych na obecność żywicy epoksydowej.

Piśmiennictwo

- [1] Aro H., Eerola E., Ano A.J.: Osteolysis after rigid fixation. The possible role of periosteal neural mechanoreceptors in bone remodelling. *Clin. Orthop. Rel.Res.* (1982), 166, 292.
- [2] Bajor G., Błażewicz M., Bohosiewicz J., Chłopek J., Stoch A.: Badania powierzchni kompozytów węglowych pokrytych hydroksyapatytem po implantacji. *Inżynieria Biomateriałów*. 3, (1998), 21-27.
- [3] Biomateriały, materiały w ochronie zdrowia i środowiska. Materiały I Krajowej Konferencji, Kraków 1994 *Ceramika* 46.

References

- [4] Chłopek J.: Kompozyt węgiel-węgiel. Otrzymywanie i zastosowanie w medycynie. *Ceramika* 52, 14, 1997.
- [5] Cieślík T.: Płytki i śruby z kompozytu węgiel-węgiel do zespożeń odłamów żuchwy. Badania doświadczalne. *Praca habilitacyjna Śl.AM, Katowice* 1993.
- [6] Damboń A., Kubacki J., Szczurek Z., Sabat D.: Badania doświadczalne nad przydatnością włókniny węglowej w uzupełnieniu ubytków kości udowej królików. *Biomateriały Węglowe i Ceramiczne, Ryto* 1995, 49-52.
- [7] Górecki A.: Przydatność włókien węglowych w śródstawowych rekonstrukcjach więzadła krzyżowego. *Praca habilitacyjna. AM Warszawa* 1983.
- [8] Grażyński J., Jankowski A., Krzyżański Z.: Aktualne poglądy na fizjologię gojenia złamań kości. *Problemy Chirurgii Dziecięcej*, 22, (1995), 153
- [9] Grochowski J., Szklarczyk S., Mieżyński W., Stankiewicz D., Obruśnik A., Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Wyniki operacyjnego leczenia ubytków kości ramiennych owiec zmodyfikowanymi wszczepami HAp. *Ceramika* 46, 8, (1994), 53-58.
- [10] Jankins D.H.R.: Ligament Induction by Filamentous Carbon Fibre. *Clin. Orthop.*, 197, (1985), 86-90.
- [11] Kuś W.M.: Badania doświadczalne nad zastosowaniem włókien węglowych w operacjach odtwórczych narządu ruchu. *Praca habilitacyjna, AM, Warszawa* 1986.
- [12] Kuś W.M., Górecki A., Benke G.: Plastyka powierzchni stawowych kolana włókniną węglową. *Biomateriały Węglowe-Carbon, Ryto* (1990), 11-13.
- [13] Lemaire M.: Reinforcement of Tendons and Ligaments with Carbon Fibers. *Clin. Orthop.*, 196, (1985), 169-174.
- [14] Louis J.P., Dabadie M.: Fibrous carbon implants for the maintenance of bone volume after tppth avulsion: first clinical results. *Biomaterials*, 11, (1990), 525-528.
- [15] Rand J., A., Kai Nan An, Chao Y., S.: A comparison of the effect of open intramedullary nailing and compression-plate fixation on fracture -site blood flow and fracture union. *J. Bone Joint Surg.*, 63-A, (1981), 427.
- [16] Sabat D., Cieślík T., Szczurek Z., Pogorzelska-Stroncak B., Zajęcki W.: Microscopic picture of guinea pigs mandible wastages healing supported by granular hydroksyapatite. *Proc. of XV Europ. Congr. of Path. Kopenhaga* 1995.
- [17] Sarmiento A., Schaffer J., Beckerman L.: Fracture healing in rat femoral as affected by functional weight-bearing. *J. Bone Joint Surgery*, 59-A, (1977), 369.
- [18] Shiota T.: Healing around hydroxylapatite coated istalled with revascularized bone graft. *Proc. of Congr. of JAOP, Hamburg* 1992.
- [19] Ślósarczyk A., Stobierska E., Paszkiewicz Z.: Hydroksyapatyt jako materiał implantacyjny. *Ceramika* 46, 8, (1994), 155-158.
- [20] Stoch A., Brożek H., Rozkrut M.: Elektroforetyczne nanoszenie hydroksyapatytu na materiały implantacyjne metaliczne lub z kompozytów węglowych. *Biomateriały Węglowe i Ceramiczne, Ryto* 1995, 74-79.
- [21] Szczurek Z., Pogorzelska-Stroncak B., Sabat D., Cieślík T.: Microscopic healing picture of defects in rabbit jaw bones as influenced by carbon cloth. *Proc. of XIV Congr. of Pathol., Insvruck*, 1993.
- [22] Tylman D.: Gojenie się złamań kości-aspekty biologiczne i wpływ czynników fizycznych. *Chir.Narz.Ruchu Ortop. Pol.*, 51, (1986), 433.
- [23] Urazy wieku dziecięcego. Materiały II i III Sympozjum Sekcji Dziecięcej Chirurgii Urazowej PTChDz, PZWL, Warszawa, 1976.
- [24] Weber B.G., Brunner Ch., Freuler F.: Treatment of fractures in Children and adolescents. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980.
- [25] IV Konferencja Biomateriały węglowe Ryto, 6-9X.1993. *Inżynieria Materiałowa*, 5/76/, XIV, 1993.
- [26] VIII Konferencja Naukowa. Biomateriały w medycynie i weterynarii, Zembrzyce 1997.