Badania *in vivo* biozgodności tkankowej i przydatności bioceramiki nowej generacji Sz2 w leczeniu ubytków kostnych

Praca doktorska

Elżbieta Menaszek

Pracę wykonano w Zakładzie Cytobiologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Promotor
Prof.dr hab. med. Kryspin Niedzielski

Kraków 2009

Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Kryspinowi Niedzielskiemu
oraz Pani Magister Marii Żołnierek,
za wsparcie i ogromną pomoc w zrealizowaniu pracy

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE 4

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 8

I WSTĘP 10
1.Biomateriały 10
1.1. Definicja 10
1.2. Rys historyczny 10
2. Materiały stosowane w leczeniu ubytków kostnych 14
2.1. Przeszczepy 15
2.2. Biomateriały stosowane w naprawie tkanki kostnej 16
2.2.1. Biomateriały pochodzenia naturalnego 17
2.2.2. Metale 18
2.2.3. Polimery syntetyczne 19
2.2.4. Bioceramika 19
3. Bioszkła jako biomateriały nowej generacji 22
4. Histochemia w badaniach reakcji tkanek na obecność biomateriału 23
5. Stan zapalny a implantacja biomateriału 25

II CEL PRACY 31

III MATERIAŁY I METODY 32
1. Badania wstępne w tkance mięśniowej 32
1.1. Materiały 32
1.2. Zwierzęta 33
1.3. Implantacja 33
1.4. Przygotowanie materiału tkankowego do badań 33
2. Badania w tkance kostnej..... 34
2.1. Materiały 34
2.2. Zwierzęta 35
2.3. Implantacja 35
2.4. Przygotowanie materiału tkankowego do badań 35
3. Metody histologiczne 36
4. Metody histochemiczne 38

ABSTRACT

Two *in vivo* experiments are described in the study.
In the first one the tissue reaction to glass and glass-ceramic biomaterials implanted into the rat skeletal muscle was examined. The materials tested previously by *in vitro* methods were estimated as biomaterials which were expected to be implants additionally stimulating the immune system cells, and consequently the regeneration of tissues. *In vivo* methods allow to evaluate the histochemical and morphological changes evoked by implanted materials in the tissue environment.

Four types of biomaterials were tested: bioglassess of new generation Sz2 and A2, and classical bioglassess based on Hench's bioceramics RM and RMC. Samples of the biomaterials were inserted in equal amounts into the gluteal muscle of adult hooded rats. After 2, 7, 30, 90, 150 and 180 days from the surgery implants with surrounding muscles were removed en block and subjected to histochemical tests for the activity of enzymes, as well as to an immunohistochemical test for the presence of fibronectin. Inflammatory cells and cells of the granulation tissue were counted in sections stained by the Pappenheim method.

The appearance of fibronectin – glycoproteid of the intercellular matrix linking A2 and Sz2 materials with cells of granulation tissue – was observed. The RM and RMC materials appeared mainly as large fragments entwined with a network of connective tissue fibres. In the 7- and 30-day series mast cells and eosinophils were found close to larger fragments of the biomaterials. In 90-, 150-, and 180-day series a clearly increasing break up was noted as well as phagocytosis of tiny particles (especially of Sz2 and A2 material) by macrophages.

The sites cleared of the biomaterials showed gradual regeneration of connective tissue, blood capillaries, and skeletal muscle fibres. Larger fragments of biomaterials were enclosed within connective tissue capsules, and in their proximity general regeneration of muscular fibres occurred along with that of fibrous connective tissue together with vessels.

The presence of biomaterial implants did not cause the distinct decrease of the activity of oxidative enzymes both in muscle and connective tissues. The activity of these enzymes was back to normal in the 30th day following the implantation.

The results of the experiment demonstrated the biocompatibility of all four materials but higher bioactivity was stated in the case of bioglasses A2 and Sz2.

The objective of the second experiment was to investigate the effect of the new generation bioglass obtained by sol-gel method on bone regeneration. Many ceramics have been used widely as bone implant materials. Among them, bioactive glasses, discovered in

1969, have drawn attention because of their favorable biological properties. Since then numerous glasses and glass ceramics have been extensively studied. Recent findings show that great results in regeneration of bone is achieved due to controlled release of the ionic dissolution products of bioactive glasses.

The study was performed on 50 male rabbits. Defects of size 20 mm x 5 mm x 5 mm experimentally made in radius of both limbs were filled with bioglass Sz2 or SiO_2. Inert silicone (SiO_2) glass was used as a control. Both materials were used in form of granules ranged from 0,5 to 0,8 mm in diameter. After 3, 7, 21, 42 and 90 days from the surgery, animals were killed and fragments of bone containing implants were excised, frozen in nitrogen and sectioned at 10 μm. The obtained cryosections were processed for the examination in light microscopy. The activity of enzymes important for the bone turnover was detected histochemically. The presence of calcium deposits was analysed by Alizarin Red S (ARS) staining.

In all samples with implanted bioglass there was a significant increase in the activity of detected enzymes and in the percentage of ARS labelled tissue surface when compared to samples with SiO2 ($p \leq 0.05$). Consequently, the new bone forming was observed much often around bioglass implants.

The results demonstrate the suitability of bioactive glass Sz2 as a scaffold for bone tissue engineering as it not only stimulates the activity of cells, but also provides an osteoconductive and osteoproductive substrate.

STRESZCZENIE

W pracy opisano wyniki dwóch eksperymentów.

Celem pierwszego było określenie charakteru odpowiedzi komórkowej tkanek mięśnia szkieletowego szczura na wprowadzone wszczepy biomateriałów szklistych i szkło-ceramicznych oraz stopnia biozgodności tkankowej tych materiałów. Wprowadzane do rany ciała obce przetestowane uprzednio metodami *in vitro* i ocenione jako biomateriały, mają pełnić funkcje implantatów dodatkowo pobudzających układ odpornościowy i następnie regenerację tkanek. Zastosowano metody *in vivo* pozwalające na ocenę zmian histochemicznych i morfologicznych zachodzących w środowisku tkankowym pod wpływem wszczepionych biomateriałów.

W badaniach testowano 4 typy materiałów: bioszkieł nowej generacji Sz2 i A2 oraz klasycznych bioszkieł opartych na bioceramice Hencha RM i RMC. Próbki biomateriałów wszczepiano w takiej samej ilości do mięśnia szkieletowego pośladkowego dorosłych szczurów rasy kapturowej. Po 2, 7, 30, 90, 150 i 180 dniach od operacji wszczepienia biomateriałów zwierzęta zabijano i pobierano tkanki do badań.

Podczas analizy mikroskopowej preparatów zawierających skrawki tkankowe poddane testom histochemicznym obserwowano obok oceny nasilenia aktywności badanych enzymów także postępy procesu regeneracji tkanek i gojenia rany.

Materiały Sz2 i A2 łatwo ulegały rozpadowi na drobne fragmenty, które z kolei ulegały fagocytozie a obszary, w których zostały zresorbowane powyższe materiały uległy całkowitej lub zaawansowanej regeneracji. Materiały RM i RMC występujące w postaci dużych okruchów zostały odizolowane torebką łącznotkankową. Materiał RMC zamknięty w torebce łącznotkankowej ulegał powolnemu rozpadowi na drobne części. Charakter przebiegu regeneracji zależał w dużym stopniu od wielkości odłamków biomateriałów.

Obecność biomateriałów nie wywołała wyraźnego obniżenia aktywności enzymów utleniających w włóknach mięśniowych szkieletowych i w tkance łącznej.
Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować o biozgodności wszystkich czterech materiałów, choć większą bioaktywnością cechowały się bioszkła Sz2 i A2.

Celem II eksperymentu było zbadanie przebiegu regeneracji kości w obecności bioszkieł nowej generacji. Od biomateriałów nowej generacji oczekuje się nie tylko zdolności

do integracji z otaczającą tkanką, ale również stymulowania procesów regeneracyjnych i w konsekwencji zastąpienia implantu nowo wytworzoną tkanką. Materiały ceramiczne są

powszechnie używanymi materiałami na implanty. Ze względu na korzystne własności biologiczne uwagę od chwili odkrycia w 1969 roku przez Hencha skupiają bioszkła. Ostatnie badania wykazały korzystne efekty w regeneracji tkanki kostnej uzyskane dzięki kontrolowanemu uwalnianiu jonów z powierzchni bioaktywnych szkieł.

Badania przeprowadzono na 50 królikach. Jednakowe ilości bioszkła Sz2 (wybranego na podstawie wcześniejszych badań) i obojętnej krzemionki SiO_2, użytej jako kontroli, wszczepiano do operacyjnie wykonanego w kości promieniowej przedniej kończyny ubytku o rozmiarach 20mm x 5mm x 5mm. Po 3, 7, 21, 42 i 90 dniach od zabiegu zwierzęta zabijano i pobierano tkanki do badań. Na zamrożonych skrawkach tkankowych przeprowadzono reakcje histochemiczne w celu wykrycia aktywności enzymów istotnych dla metabolizmu kości. Metodą alizarynową badano też stopień mineralizacji tkanek. We wszystkich próbkach z bioszkłem stwierdzono statystycznie istotne większe nasilenie aktywności enzymów w porównaniu do krzemionki. Również w obecności bioszkła częściej niż w przypadku krzemionki tworzyła się nowa tkanka kostna.

Obserwacje morfologii wszczepu oraz aktywności wybranych enzymów utleniających i hydrolitycznych świadczą o tym, że badany biomateriał Sz2 wywołuje pożądane z punktu widzenia biologicznego reakcje tkankowe.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

A2 – bioszkło nowej generacji z układu CaO-SiO2-P2O5 z dużą zawartością CaO

ARS – alizaryna red S

B - beleczki kostne

Ch - chrząstka

EN - esteraza niespecyficzna (kwaśna esteraza α – naftylu)

FA - fosfataza zasadowa (alkaliczna)

FK - fosfataza kwaśna

G6PDH - dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa

HAp - hydroksyapatyt

Kl - kolagen

K - kość

KM - komórki mezenchymatyczne

KO - komórki olbrzymie

Ł – tkanka łączna

M – tkanka mięśniowa

MR - włókna mięśniowe regenerujące

NAD+ - dinuleotyd nikotynoamido-adeninowy

NADH - zredukowana forma NAD+

NADHDH - dehydrogenaza NADH

NADP+ - fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego

NADPH - zredukowana forma NADP+

NBT - błękit nitrotetrazolowy

NK - naczynia krwionośne

NZ - naciek zapalny

Ob - osteoblasty

OCC - oksydaza cytochromu c

Ok – osteoklasty

RANKL - (ang. Receptor Activator of Nuclear Factor NF-κB ligand)

RM – szkło Hencha

RMC – szkło topione

SD - odchylenie standardowe

v-SiO_2 - szkło krzemionkowe (krzemionka)

Sz2 – bioszkło nowej generacji z układu CaO-SiO_2-P_2O_5 z dużą zawartością krzemionki

TM – tkanka mezenchymatyczna

TRAP - fosfataza kwaśna winianooporna

WK - włókna kolagenowe

Z - ziarnina

BCP -dwufazowy fosforan wapnia - mieszanina hydroksyapatytu i fosforanu trójwapniowego

Wstęp

WSTĘP

1. Biomateriały.

1.1. Definicja.

Biomateriałami nazywamy materiały, syntetyczne lub pochodzenia naturalnego, które wchodzą w kontakt z żywymi tkankami, poprawiając lub zastępując ich funkcje upośledzone na skutek choroby lub uszkodzenia [Williams, 1987].

Mówiąc o kontakcie biomateriału z tkankami mamy na myśli różnorodne formy kontaktu: z powierzchnią ciała, przezskórny, kontakt z wewnętrznymi tkankami miękkimi, twardymi oraz z krwią.

1.2. Rys historyczny.

Historia biomateriałów związana jest nierozerwalnie z historią chirurgii. Tam, gdzie niezbędna jest interwencja chirurgiczna, potrzebne są zazwyczaj i biomateriały: czy to w postaci prozaicznych opatrunków, nici do zszywania ran, czy chociażby narzędzi chirurgicznych. Bardziej spektakularne użycie biomateriałów związane jest z wykorzystaniem ich do zastąpienia chorych, uszkodzonych, lub utraconych tkanek. Wiele dziedzin chirurgii, jak ortopedia, dentystyka, oftalmologia, ma swoją własną historię biomateriałów, której trzeba by poświęcić sporo miejsca, żeby ją rzetelnie opisać. Parę przytoczonych tu faktów daje nam zaledwie wyobrażenie, jak bogata jest przeszłość ogromnej grupy przeróżnych substancji, które dopiero od niedawna noszą wspólną nazwę: „biomateriały".

Nazwa „biomateriały" jest stosunkowo młoda, ma tylko kilkadziesiąt lat, ale historia samych biomateriałów jest równie stara, jak nasza cywilizacja. Świadczą o tym nie tylko mity, jak ten ze świętej staroindyjskiej księgi Rigwedy (2500 – 1800 p.n.e.), mówiący o królowej Wiszpli, która utraciwszy w walce nogę, wróciła na pole bitwy z żelazną protezą [Vanderwerker, 1976]. Bardziej namacalnych dowodów dostarczają wykopaliska archeologiczne. Liczne znaleziska związane są z odwiecznym problemem ludzkości – chorobami i utratą zębów. Jest wiele dowodów na to, że sztukę mocowania sztucznych zębów opanowano już w starożytnym Egipcie, Rzymie, Fenicji, Chinach, Ameryce Środkowej [Courtney, 1993]. W Egipcie znaleziono m.in. szczękę z zachowanym złotym mostkiem i wstawionymi zębami, mającą ok. 4500 lat [Coleman, 1970]. Z tego samego okresu

pochodzi odkryty w Meksyku szkielet mężczyzny, któremu na miejsce spiłowanych przednich zębów umocowano sztuczną szczękę z kłów drapieżnika. Cennym eksponatem jest również szczęka z ok. 600 roku n.e. znaleziona w Hondurasie, z dwoma wstawionymi sztucznymi zębami, które bez wątpienia uległy osteointegracji za życia jej właściciela [Slavkin,1998]. Osteointegrację metalowego implantu z kością szczęki zaobserwowano także w szczątkach znalezionych w galorzymskim pochówku z ok. I-II wieku n.e. [Crubezy i wsp., 1998]. Z kolei znaleziska z Peru są dowodem na to, że już inkascy chirurdzy dokonywali zabiegów trepanacji czaszki, a ubytki wypełniali szlachetnymi metalami [Sanan i Haines, 1997].

Tysiące lat temu używane były również inne biomateriały - jako opatrunki, bandaże, nici do zszywania tkanek. Pierwsze wzmianki o bandażach znaleziono w sumeryjskich źródłach z 2100 r. p.n.e. Najstarsze znalezione nici chirurgiczne znajdowały się w tkankach mumii pochodzącej z ok. 1100 roku p.n.e. Opis nici chirurgicznych wykonanych z różnych materiałów: z bawełny, ścięgien zwierzęcych, końskich włosów lub włókien roślinnych zawierają księgi Susruty, „ojca chirurgii" żyjącego w Indiach prawdopodobnie w VI w p.n.e [Peltier, 1990]. Starożytni Egipcjanie używali nici z lnu. Metaliczne nici chirurgiczne po raz pierwszy są wspomniane w starożytnej literaturze greckiej. Galen z Pergamonu (Claudius Galenus, 129-199 n.e.), jeden z najsłynniejszych lekarzy starożytności oprócz instrukcji, jak należy używać nici z lnu do zszywania ran, opisał zastosowanie złotego drutu do podwiązania tkanek [Ratner, 2004].

Nowoczesna historia biomateriałów związana jest z rozwojem chirurgii. Próby stosowania różnego rodzaju implantów kończyły się zazwyczaj niepowodzeniem, aż do II połowy XIX wieku, kiedy, głównie dzięki brytyjskiemu chirurgowi Johnowi Listerowi, odkryto i wprowadzono do chirurgii zasady antyseptyki. Od tego momentu chirurdzy coraz częściej szukali materiałów, mogących wspomóc lub zastąpić chore i uszkodzone tkanki. Przez wiele lat postęp w tej dziedzinie zależał od eksperymentów opartych na metodzie prób i błędów. Czasem osiągano sukces, praktycznie jednak, aż do połowy XX wieku, były to zazwyczaj materiały źle dobrane i w rezultacie niespełniające swojej roli [Hench, 1998].

Mimo wielu podejmowanych prób, przełom w tej dziedzinie medycyny nastąpił dopiero w II połowie XX wieku. Ostatnie 40 lat badań zaowocowało wynalezieniem około 40 różnego typu biomateriałów stosowanych w leczeniu i uzupełnianiu ubytków różnych części ciała [Hench i Wilson, 1993; Ratner i wsp, 2004]. Do XX wieku głównym biomateriałem stosowanym w chirurgii i stomatologii były metale. Wraz z rozwojem przemysłu

wynajdowano coraz to nowe stopy metali, które również znajdowały zastosowanie jako materiał na implanty. W 1937 roku A.E. Strock z Uniwersytetu w Harwardzie opublikował pracę o skutkach stosowania u zwierząt i ludzi implantów ze stopu kobalt-chrom-molibden [Slavkin,1998]. Implanty te z powodzeniem stosowane są do dzisiaj. Niezwykle istotne dla rozwoju nowoczesnej implantologii były obserwacje szwedzkiego chirurga-ortopedy, P.I. Branemarka. W 1952 roku rozpoczął on serię badań, w których wykazał osteointegracyjne własności tytanu. Od tej pory tytan i jego stopy są wciąż najczęściej używanym materiałem na implanty. Materiały niemetaliczne na szerszą skalę weszły do użytku znacznie później niż metale, bo dopiero od połowy XX wieku. Syntetyczne polimery zaczęto wprowadzać do chirurgii po roku 1940, szczególnie, że wcześniej znano niewiele "plastików". W 1941 r. po raz pierwszy użyto nylonowej nici chirurgicznej, a w 1946 J. i R. Judet zastosowali polimer PMMA – polimetakrylan metylu w protezie stawu. W 1949 roku brytyjski okulista, Harold Ridley przeprowadził zabieg implantacji sztucznej soczewki, również wykonanej z polimetylometakrylanu. O zastosowaniu tego materiału zdecydowały obserwacje Ridley'a, który miał pod opieką pilotów z „wszczepionymi" do gałek ocznych odłamkami z plastikowych osłon kabin samolotów bojowych – pozostałościami walk stoczonych w powietrzu podczas II wojny światowej. Okazało się, że odłamki były dobrze tolerowane, w nowoczesnym rozumieniu tego słowa – biokompatybilne. Tkanka wokół nich goiła się, a ciało obce nie przeszkadzało w funkcjonowaniu oka. Zachęcony tymi spostrzeżeniami, Ridley przeprowadził pionierską operację, w której sztuczną, plastikową soczewką zastąpił zmętniałą soczewkę oka u pacjentki cierpiącej na kataraktę. W ten sposób, zwracając uwagę na biokompatybilność materiału, zapoczątkował również nowoczesne podejście do zagadnienia biomateriałów i biotolerancji [Apple, 2004; Ratner, 2004].

Dalsze lata przynosiły coraz to nowe zastosowania biomateriałów. W 1951 r. amerykański chirurg, Charles Hufnagel wynalazł sztuczną zastawkę serca. Inny amerykański chirurg, Arthur Voorhees zapoczątkował stosowanie syntetycznych protez naczyniowych: w 1952 roku pierwszy pacjent otrzymał protezę aorty wykonaną z polimeru Vinyon N (PVC – poli(chlorek) winylu) - z materiału, z którego wcześniej szyto spadochrony [Blakemore i Voorhees,1954]. Następne lata, 60-te, to okres ogromnego sukcesu brytyjskiego chirurga Johna Charnley'a, który po wcześniejszych próbach z różnymi materiałami zastosował z powodzeniem protezę stawu biodrowego wykonaną z metalu i polietylenu [Gomez

i Morcuende, 2005]. W tym samym okresie amerykańscy chirurdzy plastyczni, Cronin i Gerow opracowali, popularne do dziś, silikonowe implanty piersi [Cronin i Gerow, 1963].

W latach 70-tych grupa biomateriałów powiększyła się o materiały ceramiczne. Wprowadzono syntetyczny hydroksyapatyt - Ca10(PO4)6(OH)2, będący materiałem tworzącym silne chemiczne połączenie z tkanką kostną in vivo, odkryto i zaczęto stosować bioszkło, wykazujące bardzo korzystne cechy, pomocne w regeneracji tkanki kostnej [LeGeros i LeGeros, 1993; Hench i Andersson, 1993].

Dzięki zastosowaniu nowatorskich metod w chirurgii, udało się uratować życie tysięcy ludzi, zanim jeszcze rozwinęła się nauka o biomateriałach i zanim poznano biologiczne mechanizmy reakcji organizmu na implant. Osiągnięcia chirurgów poszukujących nowych rozwiązań stały się podstawą nowoczesnej nauki o biomateriałach. Od połowy XX wieku nauka o biomateriałach przestała wreszcie być domeną chirurgów, rozpaczliwie szukających biomateriałów mogących pomóc ich pacjentom, eksperymentujących na własną rękę i podejmujących samodzielnie decyzje, jaki materiał zastosować w danym przypadku. Biomateriały stały się przedmiotem wspólnych badań inżynierów, chemików, biologów i lekarzy. W 1975 roku, najpierw w Stanach Zjednoczonych, a później w Europie, powstało Towarzystwo Biomateriałów (Society for Biomaterials), mające za zadanie ujednolicenie systemu wytwarzania i wdrażania nowych materiałów oraz stworzenie odpowiednich regulacji prawnych [Ratner, 2004].

Wraz z rozszerzaniem gamy biomateriałów zmieniło się też spojrzenie na funkcje, jakie biomateriały mają spełniać w organizmie. Powstały nowe dziedziny nauki, zajmujące się badaniem właściwości materiałów oraz reakcji następujących między materiałem a żywą tkanką.

Stopniowo zmieniał się też pogląd, jakie cechy powinny charakteryzować idealny biomateriał. Pierwotnie główną funkcją biomateriału było wypełnienie w postaci protezy miejsca po usuniętej lub obumarłej tkance. Z czasem zaczęto szukać biomateriałów mogących aktywnie uczestniczyć w odbudowie tkanki, naśladujących naturalną substancję międzykomórkową, umożliwiających przyleganie, proliferację i różnicowanie komórek.
Biorąc pod uwagę zmieniający się stosunek badaczy i lekarzy do biomateriałów, J.M. Anderson dzieli nowożytną historię nauki o biomateriałach na trzy okresy (Tab. 1).

Tabela 1. Podział historii nauki o biomateriałach na okresy ze względu na zmieniającą się funkcję biomateriałów

1950–1975	bioMATERIAŁY (materiały inertne)
1975–2000	BIOMATERIAŁY (materiały aktywne)
2000–	BIOmateriały (materiały aktywne, stymulujące tkanki gospodarza, ulegające degradacji lub resorpcji)

I okres obejmuje lata 1950 – 1975, kiedy uważano, że najlepszym materiałem na implant jest materiał obojętny, nie wywołujący reakcji organizmu gospodarza. Biomateriały z tego okresu Anderson nazywa bioMATERIAŁAMI, z naciskiem na właściwości samego materiału, z mniejszą uwagą skupioną na reakcji tkanek. Kolejny, II okres, to lata 1975 – 2000. W tym czasie zaczęto dostrzegać biologiczny aspekt relacji biomateriał - gospodarz. Coraz lepsze zrozumienie zagadnień biologii komórki i biologii molekularnej pozwalało poznać interakcje zachodzące w miejscach kontaktu biomateriał – tkanki gospodarza. Zamiast materiałów inertnych poszukiwano BIOMATERIAŁÓW aktywujących tkanki gospodarza. Zdolności materiału do wytworzenia relacji z żywymi tkankami stały się równie ważne, jak ich własności fizyczne, chemiczne i mechaniczne. Właściwości biomateriałów rozważano nie tylko z punktu widzenia zachowania w laboratorium, ale także interakcji pomiędzy biomateriałem a tkankami i płynami fizjologicznymi.

Rok 2000 zapoczątkował III okres, w którym naukowcy skupiają się nad rozwojem inżynierii tkankowej i medycyny regeneracyjnej. Rolą biomateriału ma być pomoc i stymulacja naturalnych procesów naprawy. Nazwa BIOmateriały odzwierciedla, jak ważny w nowoczesnym podejściu do zagadnienia jest aspekt biologiczny. Sam materiał zaś, po spełnieniu swojej funkcji, powinien zniknąć z tkanek w drodze resorpcji lub biodegradacji [Anderson, 2006].

2. Materiały stosowane w leczeniu ubytków tkanki kostnej.

Kość jest tkanką, która ulega ciągłej przebudowie. Zjawisko to po raz pierwszy zostało opisane w 1892 r przez Wolffa w pracy: "The Law of Bone Remodeling" [Wolff, 1986]. W celu przystosowania się do ciągłych zmian obciążenia mechanicznego i utrzymania homeostazy mineralnej, kości przez całe życie znajdują się w dynamicznym stanie wzrostu i resorpcji. Cykl całkowitej odnowy kośćca u człowieka w warunkach prawidłowych trwa ok.

10 lat [Ostrowski, 1995]. U coraz większej liczby osób dochodzi jednak do upośledzenia tego procesu: na skutek starzenia się, osteoporozy, chorób reumatycznych, nowotworów i urazów mechanicznych [Fourney i wsp., 2003; Kuokkanen i wsp., 2001]. W przypadkach znacznej utraty tkanki kostnej, w których organizm nie jest w stanie samodzielnie naprawić uszkodzenia (tzw. ubytek krytyczny) potrzebna jest interwencja chirurgiczna. Możliwe są dwie opcje: wykonanie przeszczepu lub wprowadzenie implantu [Malloy i Hilibrand, 2002; Bolder, 2001; An i wsp., 2000].

2.1. Przeszczepy.

Przeszczepy tkanki kostnej są najstarszym i zarazem wciąż najczęściej stosowanym środkiem w leczeniu chorób układu kostnego. Pierwszy udokumentowany zabieg przeszczepu tkanki kostnej został przeprowadzony przez holenderskiego chirurga van Meekerena w 1668 roku. Zabieg uzupełnienia ubytku w czaszce fragmentem kości pobranej z czaszki psa zakończył się powodzeniem [Boer, 1988], choć pacjent został ekskomunikowany przez kościół. Wziąwszy dodatkowo pod uwagę stan ówczesnej wiedzy medycznej, widać, że nie było wówczas sprzyjającego klimatu do tego typu zabiegów. Dalsze próby podjęto dopiero w XIX w, a początki współczesnej transplantologii zawdzięczamy chirurgom działającym na przełomie XIX i XX wieku [Schweiberer i wsp, 1989].

W przypadku przeszczepu mamy trzy możliwości:

- przeszczep autogeniczny,
- przeszczep allogeniczny,
- przeszczep ksenogeniczny.

Przeszczep autogeniczny.

Najkorzystniejszy jest przeszczep autogeniczny, gdzie przeszczepia się własną tkankę, pobraną ze zdrowego miejsca (najczęściej ze szczytu biodrowego), dostarczając do miejsca ubytku wszystkie potrzebne składniki: komórki kościotwórcze, kostne białka morfogenetyczne i wszelkie czynniki wzrostu, nie ryzykując przy tym odrzucenia przeszczepu [Gazdag i wsp., 1995]. Niestety, z racji pochodzenia materiału, jego zasoby są ograniczone, często też stan zdrowia pacjenta nie pozwala na zabieg pobrania materiału do przeszczepu. Ponadto, zabieg może powodować dodatkowe powikłania (chroniczny ból, krwawienie, ryzyko infekcji, uszkodzenie nerwów) w miejscu, skąd materiał na przeszczep został pobrany [Babovic i wsp., 2000].

Przeszczep allogeniczny.

Dość dobre wyniki uzyskuje się przy zastosowaniu przeszczepu allogenicznego. Przeszczep allogeniczny, czyli przeszczep od innego osobnika tego samego gatunku, ze względu na różnice antygenowe, może jednak prowadzić do rozwinięcia odpowiedzi immunologicznej i w efekcie do jego odrzucenia. Nawet w przypadku przyjęcia się przeszczepu, w ponad połowie przypadków obserwuje się następujące z czasem osłabienie allograftu: zmniejszenie gęstości tkanki, drastyczne zwiększanie się liczby niegojących się mikrozłamań, resorpcję tkanki [Wheeler, 2005]. Argumentem przeciwko przeszczepom allogenicznym jest też możliwość przeniesienia groźnych patogenów, mogących wywołać u biorcy takie choroby, jak AIDS, żółtaczka typu B i C, choroby prionowe lub nowotwory [Tomford i Mankin, 1999; Friedlander, 2000].

Przeszczep ksenogeniczny.

Z podobnym ryzykiem, jak w przypadku przeszczepów allogenicznych, związane są przeszczepy ksenogeniczne, czyli przeszczepy od osobników innego gatunku niż biorca. Przeszczepy ksenogeniczne są łatwiej dostępne, ale są też zdecydowanie szybciej odrzucane. Poważnym problemem w przypadku przeszczepów ksenogenicznych są też obce patogeny, niegroźne dla zwierząt, od których pobieramy tkanki, a mogące wywołać nieprzewidywalną i zupełnie niekontrolowaną reakcję w organizmie biorcy (podobnie jak to się stało w przypadku wirusa HIV).

Wobec powyższego zrozumiałe jest zainteresowanie biomateriałami, które zastępowałyby przeszczepy tkankowe w regeneracji kości.

2.2. Biomateriały stosowane w naprawie tkanki kostnej.

Biomateriały stanowią bardzo różnorodną grupę tworzyw. Zarówno ze względu na pochodzenie – mogą być materiałami naturalnymi, otrzymanymi z roślin lub zwierząt, albo materiałami syntetyzowanymi chemicznie, ze względu na formę – mogą mieć postać proszków, granul, gąbek, lub litych kształtek, jak i ze względu na własności fizyko-chemiczne – mogą być kruche lub elastyczne, stabilne albo rozpuszczalne całkowicie/częściowo w środowisku fizjologicznym [Davis, 2003; Agrawal, 1998]. Mogą być używane w postaci czystej, lub jako składnik kompozytu. Biorąc pod uwagę własności biologiczne - mogą być inertne, czyli wywołujące znikomą odpowiedź organizmu, albo bioaktywne, czyli stymulujące tkanki gospodarza do oczekiwanych reakcji. I wreszcie, mogą być stosowane

samodzielnie, jako proteza, wypełnienie ubytku, lub jako element konstruktu tkankowego, gdzie stanowią nośnik, podłoże dla komórek [Langer R, 2004].

Ze względu na pochodzenie materiału, z jakiego wszczepy zostały wytworzone, dzielimy je na:

- naturalne, pochodzenia ludzkiego, zwierzęcego lub roślinnego, które stanowią głównie zdewitalizowane i poddane obróbce tkanki;
- polimery naturalne, takie jak kolagen, jedwab czy fibrynogen oraz chityna i celuloza;
- polimery syntetyczne, jak poliamidy, poliestry, pochodne kwasu poliglikolowego, polimetakrylan metylu, polietylen, żywice epoksydowe, poliuretany i wiele innych;
- metale i ich stopy, od powszechnie znanych z niereaktywności metali szlachetnych (złoto, platyna) po najnowsze stopy;
- wszczepy ceramiczne, które często definiowane są jako materiał, który nie jest ani metalem ani tworzywem organicznym, otrzymywany w trakcie procesów, których istotnym elementem jest obróbka cieplna, mający strukturę krystaliczną o różnym stopniu przekrystalizowania (HAp lub szkło-ceramika) lub amorficzną (bioszkło).

2.2.1. Biomateriały pochodzenia naturalnego.

Koral naturalny

Koral, podobnie jak kość, składa się z fazy organicznej i mineralnej. Do wytwarzania porowatych implantów, które mają idealną strukturę porów dla tkanki kostnej, używa się szkieletu korali – części nieorganicznej, składającej się głównie z węglanu i fosforanu wapnia z dodatkiem jonów strontu, magnezu i fluoru. Jest materiałem biokompatybilnym i stanowi bardzo dobre rusztowanie dla proliferujących komórek, ze względu na korzystną wielkość porów. Należy też do bardzo wąskiej grupy materiałów tworzących w warunkach in vivo bezpośrednie połączenie z tkankami, zarówno kostną, jak i miękkimi. Stopniowo ulega resorpcji i zastąpieniu przez nowowytworzoną tkankę [Guillemin i wsp., 1987; Pollick i wsp., 1995], choć według niektórych autorów proces rozpadu przebiega zbyt szybko, a sam materiał jest niestabilny [Ben-Nissan, 2003].

Algi

Otrzymuje się z nich ceramiczny fosforan wapnia, który ma bardzo porowatą strukturę i szorstką powierzchnię. Materiał ten, wszczepiony w miejsce ubytku kostnego, umożliwia

adhezję białek i komórek, jest powoli resorbowany i zastępowany nową tkanką kostną [Le Guéhennec, 2004].

Kości ludzkie lub zwierzęce

Materiał kostny stosuje się po obróbce, mającej na celu pozbawienie go albo frakcji mineralnej, albo białkowej.

Kości pochodzące od osobników tego samego gatunku poddaje się demineralizacji, uzyskując DBM (ang. Demineralized Bone Matrix) - implant składający się z substancji międzykomórkowej, zawierający kolagen oraz białka niestrukturalne, w tym czynniki wzrostu, dzięki którym materiał ma własności osteoinduktywne. Efekty zastosowania takiego implantu są tylko nieznacznie gorsze niż przy zastosowaniu autoprzeszczepu, natomiast zdecydowanie lepsze od alloprzeszczepu [Martin i wsp., 1999; Maddox i wsp. 2000; Lieberman i Friedlaender, 2005]. Wadą DBM jest, podobnie jak w przypadku alloprzeszczepu, odpowiedź immunologiczna biorcy oraz możliwość transferu wirusów czy innych czynników chorobotwórczych..

Z kolei z kości ludzkich lub wołowych poddanych procesom liofilizacji i odbiałczania, lub obróbce termicznej i chemicznej, uzyskuje się podłoże mineralne o wysokich własnościach osteogennych, gotowe do zasiedlenia przez komórki kostne. Dobre efekty w leczeniu uszkodzonej tkanki kostnej uzyskano stosując wprowadzony na rynek preparat Bio-Oss [Valentini i wsp., 1998; Piatelli i wsp., 1999]. Należy jednak pamiętać, że usunięcie komponentu białkowego pozbawia materiał własności antygenowych, natomiast nie chroni przed niebezpieczeństwem przeniesienia czynników patogennych [Le Guéhennec, 2004].

2.2.2. Metale.

Materiały metaliczne stanowią największą dotychczas grupę materiałów stosowanych w chirurgii kostnej. Powszechnie stosowane są stale austenityczne Cr-Ni-Mo, tytan i jego stopy, stopy na osnowie kobaltu, tantal, niob i ich stopy, metale szlachetne oraz stopy z pamięcią kształtu [Marciniak, 2002]. Ze względu na wytrzymałość mechaniczną metale stosowane są jako implanty w układzie mięśniowo-szkieletowym, w miejscach przenoszących znaczne obciążenia mechaniczne. Z metali i ich stopów produkowane są endoprotezy stawowe, elementy do zespalania odłamów kostnych, stabilizatory. Są również stosowane w protetyce stomatologicznej, kardiochirurgii i kardiologii zabiegowej.

Mimo, że w wielu przypadkach materiały metaliczne są niezastąpione, należy pamiętać, że w agresywnym chemicznie środowisku biologicznym mogą ulegać korozji

i powodować metalozy, a w konsekwencji przyczyniać się do rozwoju niekorzystnych reakcji w organizmie [Marciniak i Paszenda, 1999].

2.2.3. Polimery syntetyczne.

Polimery stanowią dużą, bardzo zróżnicowaną grupę materiałów stosowanych zarówno w jednorazowych urządzeniach medycznych, jak i elementach endoprotez (polimery niedegradowane, wykazujące dużą odporność na działanie środowiska biologicznie czynnego; należy jednak podkreślić, że żaden z polimerów niedegradowalnych dostępnych obecnie, nie jest całkowicie odporny na działanie środowiska biologicznego). Polimery stosuje się również jako rusztowania dla wzrostu komórek i jako nośniki leków [Langer, 2001], a nawet genów [Wood i wsp., 2008] (polimery bioresorbowalne, które powinny degradować się w środowisku biologicznie czynnym do nieszkodliwych produktów ubocznych). Zaletą polimerów jest możliwość regulowania ich masy cząsteczkowej i szybkości degradacji. Nie bez znaczenia jest też fakt, że materiały te są stosunkowo tanie w produkcji [Gogolewski, 2003].

2.2.4. Bioceramika.

Biomateriały ceramiczne stosowane są w medycynie w celu odbudowy i zastępowania chorych lub uszkodzonych kości od około pół wieku. Biorąc pod uwagę aktywność materiału w kontakcie z tkankami, bioceramikę dzieli się na: resorbowalną, prawie obojętną i bioaktywną. Materiały bioceramiczne wytwarzane są w postaci proszków, granul o różnej wielkości, litych lub porowatych kształtek

Zaletą ceramiki w zastosowaniach medycznych jest wysoka odporność na ścieranie i ściskanie oraz niski ciężar i sztywność zbliżone do ciężaru i sztywności kości, ale ze względu na swoją kruchość wykorzystywane są jako implanty w miejscach nie przenoszących zbyt wysokich obciążeń. Prawie obojętne tworzywa ceramiczne są biozgodne, w organizmie nie reagują z jego płynami ustrojowymi, nie podlegają pod ich wpływem korozji i degradacji. Materiały ceramiczne łatwo się wgajają i obrastają tkankami naturalnymi, co pozwala wytworzyć dobre połączenie między implantem a żywą tkanką. Wykorzystywane są głównie w ortopedii i stomatologii [Wiliams, 2003].

Choroby i uszkodzenia układu kostnego powodują znaczne obniżenie jakości życia, stąd intensywne poszukiwania materiałów pomocnych w ich leczeniu. Materiały syntetyczne stosowane w regeneracji kości muszą spełniać fizyczne i biologiczne wymogi tkanek,

z którymi są w bliskim kontakcie, nie mając zazwyczaj zdolności tworzenia z nimi ścisłych powiązań. Bioaktywne materiały ceramiczne są jedynymi materiałami, które umożliwiają integrację implantu z żywą tkanką w miejscu defektu, niezależnie od postaci, w jakiej są stosowane: proszków, granul, gąbek, warstw, kształtek gęstych [Hench, 1991, Kim, 2001]. Bioceramikę wykorzystuje się również w materiałach kompozytowych, łącząc bioaktywne własności ceramiki z korzystniejszymi własnościami mechanicznymi innych materiałów. Tam, gdzie uwarunkowania mechaniczne wymagają stosowania bardziej wytrzymałych implantów metalicznych, poprawia się ich własności poprzez pokrycie ich warstwą bioaktywnych materiałów ceramicznych [Campbell, 2003].

Do materiałów ceramicznych należą: korund, hydroksyapatyty, ceramika whitelockitowa, węgiel, materiały szkło-ceramiczne i szkła bioaktywne.

Ceramika korundowa

Jednym z rodzajów bioceramiki jest ceramika korundowa - jej podstawowym składnikiem (99,5%) jest korund, czyli tlenek glinu (Al2O3). W ortopedii z ceramiki korundowej wykonuje się endoprotezy stawów, elementy do odbudowy fragmentów kości twarzowej części czaszki, w stomatologii – wszczepy śródkostne; jest ona także wykorzystywana do powlekania wszczepów metalowych. Badania potwierdziły bardzo dobre własności mechaniczne i dobrą biozgodność materiałów korundowych. Dzięki porowatej strukturze materiału możliwe jest wrastanie na teren implantu nowowytworzonej tkanki kostnej. Ceramika korundowa jest materiałem, który już od wielu lat jest stosowany w leczeniu ubytków kostnych [Bieniek i Oleszkiewicz, 1985].

Ceramika oparta o fosforany wapnia

Bioceramika oparta o fosforany wapnia, mająca skład chemiczny i fazowy zbliżony lub identyczny ze składem mineralnej frakcji tkanki kostnej, jest obecnie jednym z najlepszych materiałów przeznaczonych do uzupełniania ubytków kości. Stosowana jest w formie różnego rozmiaru granulatów, mikro- i makroporowatych oraz gęstych kształtek, jako materiał jednofazowy i jako składnik kompozytów BCP. Odznacza się wysoką biozgodnością oraz bioaktywnością, bardzo dobrze adaptuje się w żywym organizmie. Ze względu na słabe parametry mechaniczne, w miejscach narażonych na duże obciążenia stosuje się implanty wykonane z bardziej wytrzymałych materiałów, np. metali, ale pokrytych cienką warstwą ceramiki [Ślósarczyk, 1997].

Ceramika whitelockitowa TCP - $Ca_3(PO_4)_2$ jest materiałem, który charakteryzuje wysoka rozpuszczalność. Łatwo ulega resorpcji i biodegradacji w organizmie.
Materiały hydroksyapatytowe (HAp) - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, w przeciwieństwie do innych fosforanów wapnia, są stabilne w warunkach fizjologicznego pH. Aktywnie uczestniczą w wytwarzaniu wiązań z otaczającą tkanką kostną, stymulują tworzenie się nowej kości w miejscach ubytku. Zastosowanie HAp przyspiesza regenerację tkanki kostnej.

Węgiel

Nazwa „węgiel" obejmuje grupę różnorodnych materiałów, które różnią się między sobą budową (materiały amorficzne i krystaliczne), postacią (proszki, włókna, warstwy) i własnościami fizyko-chemicznymi. Są bardzo dobrze tolerowane przez organizm, przy czym w zależności od budowy i postaci, w środowisku tkankowym mogą wykazywać własności inertne lub bioaktywne. Od budowy i postaci zależą też ich własności mechaniczne, które mogą być zmieniane w szerokim zakresie. Doskonałymi własnościami mechanicznymi charakteryzuje się węgiel diamentopodobny, czyli sztuczny diament, którym pokrywa się metalowe protezy, chroniąc je przed korozją i ścieraniem. Największe zastosowanie znalazły materiały węglowe w postaci włókien, z których wykonuje się nici chirurgiczne do zszywania tkanek w narządach wewnętrznych oraz taśm i plecionek, wykorzystywanych do rekonstrukcji więzadeł i ścięgien. Materiały węglowe wykorzystywane są też jako składnik kompozytów, z których wykonuje się m.in. trzpienie endoprotez stawu biodrowego czy płytki węglowe do wypełniania ubytków lub zespalania kości. Węgiel amorficzny (szklisty) jest stosowany do pokrywania powierzchni, m.in. protez naczyniowych, zastawek serca, membran wytwarzanych z polimerów syntetycznych oraz do stomatologicznych wszczepów śródkostnych.

Bioszkła i materiały szkło-ceramiczne

Wspólną cechą bioaktywnych szkieł i szkło-ceramiki jest ich zdolność do modyfikacji powierzchni, polegająca na tworzeniu się warstwy aktywnego biologicznie hydroksyapatytu węglanowego (HCA), który umożliwia naturalne połączenie implantu z tkanką kostną. Warstwa HCA, która powstaje na powierzchni bioaktywnego implantu podczas kontaktu z płynami ustrojowymi, chemicznie i strukturalnie odpowiada składowi i budowie mineralnej fazy kości [Hench, 1991; Łączka 1998]. Tak, jak w przypadku pozostałych typów ceramiki,

bioszkła i szkło-ceramika mogą być wytwarzane w postaci proszków, granul, materiałów gęstych i porowatych.. Od lat wykorzystywane są w ortopedii i stomatologii, ale tam, gdzie

wymagana jest duża wytrzymałość mechaniczna, są stosowane tylko jako komponent, np. w postaci warstwy, dodając właściwości bioaktywnych materiałom o lepszych właściwościach mechanicznych.

3. Bioszkła jako biomateriały nowej generacji.

W 1969 roku Larry Hench podjął badania sprawdzające tezę, iż szkła krzemionkowe i szkło-ceramika zawierające wysokie ilości jonów wapniowych i fosforanowych nie będą odrzucane przez kość w warunkach *in vivo*. Okazało się, że szkło 45S5 (zawierające 44,5 wt. % SiO2, 24,5%wt CaO, 24,5%wt Na2O, 6%wt P2O5), nazwane później Bioglass 45S5, jest doskonałym materiałem, tworzącym mocne powiązanie z kością. Późniejsze badania wykazały, że pod wpływem płynów ustrojowych na powierzchni bioszkła zmienia się skład chemiczny i na miejscu krzemionkowych powstają struktury fosforanowe, przypominające hydroksyapatyt [Clark i wsp, 1976]. Bioszkło jest pierwszym syntetycznym materiałem tworzącym bezpośrednie wiązanie z żywą tkanką. Przez 50 lat, które upłynęły od wynalezienia bioszkła, sam Hench i rzesza badaczy na całym świecie pracują nad udoskonaleniem bioszkła i znalezieniem formuły, która najlepiej spełni swoje zadanie w zastępowaniu i leczeniu tkanek kostnych.

Od biomateriałów nowej generacji oczekuje się zdolności do integracji z otaczającą tkanką oraz stymulacji procesów regeneracyjnych i w konsekwencji zastąpienie implantu nowo wytworzoną tkanką. Materiałami spełniającymi takie oczekiwania mogą być bioszkła wytwarzane metodą zol-żel wykazujące wyższą bioaktywność w porównaniu z materiałami tradycyjnymi. Procesy zol- żel opierają się na niemal równocześnie zachodzących reakcjach hydrolizy i polikondensacji. W wyniku tych reakcji uzyskuje się zol a następnie żel. Bioszkła uzyskane dzięki tej metodzie, o temperaturze obróbki termicznej nieprzekraczającej zwykle 800oC, zachowują na powierzchni grupy OH połączone z atomami krzemu (aktywne grupy powierzchniowe Si-OH, od których rozpoczyna się krystalizacja hydroksyapatytu), są porowate i mają wysoko rozwiniętą powierzchnię, co wpływa na wyższą ich aktywność chemiczną w środowisku płynów ustrojowych. W symulowanym środowisku biologicznym pokrywają się powierzchniową warstwą hydroksyapatytu już po upływie 24 godzin, podczas gdy na materiałach o tym samym składzie chemicznym, ale otrzymanych tradycyjną metodą topienia, powierzchniowa krystalizacja hydroksyapatytu zachodzi dopiero po upływie 3 dni. Wszystkie te cechy decydują o bioaktywności tych materiałów i ich przydatności w praktyce

klinicznej, co zostało potwierdzone w licznych badaniach in vitro i in vivo [Oonishi i wsp., 1997; Łączka, 2003].

Bioszkła mogą być wytwarzane w różnorodnej formie: zarówno w postaci litych lub porowatych kształtek, jak i proszków lub granul. Szczególnie te ostatnie znajdują zastosowanie do wypełniania ubytków kostnych, ze względu na łatwe dostosowanie się do kształtu defektu, jak i na dodatkowe rozwinięcie powierzchni, co wpływa na zwiększenie właściwości bioaktywnych materiału [Vogel i wsp., 2001].

Ze względu na bioaktywność bioszkła a nie zawsze wystarczające właściwości mechaniczne, podejmowane są próby łączenia go z innymi materiałami, np. polimerami lub metalami. Bioszkło stosuje się jako skladnik kompozytów lub pokrycie materiałów metalicznych. Obiecujące wyniki uzyskano w eksperymencie *in vitro*, w którym badano zachowanie komórek osteoblastycznych MG-63 na powierzchniach tytanowych z napyloną metodą ablacji laserowej warstwą hydroksyapatytu zmieszaną z bioszkłem Sz2. Dodatek bioszkła zdecydowanie poprawił żywotność, proliferację i adhezję komórek do powierzchni implantów [Mróz i wsp., 2008].

Ciekawe rezultaty uzyskano również przez wytworzenie kompozytu z bioszkła i hydroksyapatytu - materiałów, dających dobre efekty w regeneracji kości, ale mających słabą wytrzymałość mechaniczną. Przy zastosowaniu optymalnej temperatury podczas produkcji kompozytu uzyskano materiał o wyższej wytrzymałości mechanicznej niż materiały wyjściowe [Gollera i wsp., 2003].

4. Histochemia w badaniach reakcji tkanek na obecność biomateriału.

Histochemia jest nauką łączącą dwie, w zasadzie wykluczające się, dziedziny biologii: histologię i biochemię. Histologia skupia się na obrazie utrwalonej struktury komórek i tkanek, podczas gdy biochemia zajmuje się ich metabolizmem, używając do oznaczeń materiału, który poddaje się uprzednio homogenizacji. Dysponując niewielką ilością materiału eksperymentalnego, można zatem wykonać badania albo histologiczne, albo biochemiczne. Histochemia natomiast pozwala na jednoczesne badania struktury (histologia) i metabolizmu tkanki (biochemia). Obejmuje zbiór metod pozwalających na umiejscowienie w komórkach i tkankach określonych substancji chemicznych i enzymów. Metody te umożliwiają śledzenie badanych reakcji dokładnie w miejscu ich powstawania, gdyż w przeciwieństwie do metod biochemicznych nie wymagają zniszczenia struktury badanej tkanki.

Reakcje histochemiczne prowadzą do uwidocznienia w preparacie mikroskopowym jedynie ściśle określonych substancji lub grup chemicznych, będących przedmiotem badań. Cechuje je zatem specyficzność (swoistość) stanowiąca podstawową cechę metodyki histochemicznej.

Co istotne, metodami histochemicznymi można wykazać zmiany w tkance, która w rutynowym badaniu histopatologicznym nie wykazuje odchyleń od stanu prawidłowego.

W celu oceny procesów metabolicznych zachodzących w tkankach w obecności implantu, bada się aktywność enzymów, których działanie jest szczególnie istotne dla prawidłowego funkcjonowania komórek.

Wykrywanie enzymów metodami histochemicznymi nie polega na lokalizowaniu enzymów jako substancji, lecz uwidacznia ich aktywność. Wykrywany enzym musi być czynny – konieczne jest szczególne przygotowanie tkanki do takich badań, aby nie zahamować aktywności enzymatycznej. Do środowiska reakcji wprowadza się substrat(y), które ulegają przemianie na barwny (lub elektronowo gęsty) produkt reakcji pod wpływem katalitycznej funkcji wykrywanego enzymu.

Dla prawidłowego funkcjonowania komórek istotna jest aktywność enzymów uczestniczących w przebiegu najważniejszych procesów metabolicznych, takich jak oddychanie. Do grupy enzymów tzw. podstawowego metabolizmu należą enzymy łańcucha oddechowego: oksydaza cytochromowa (OCC) i dehydrogenaza NADH (NADHDH) oraz dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (G6PDH).

Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa, silnie specyficzna w stosunku do NADP+, katalizuje utlenianie glukozo-6-fosforanu do 6-fosfoglukonianu. Jest to pierwszy z enzymów na drodze pentozowego cyklu przemiany glukozy, alternatywnego dla glikolizy. Reakcja katalizowana przez G6PDH jest nieodwracalna i kontroluje nasilenie przemian tego szlaku. Głównym zadaniem szlaku pentozowego jest wytworzenie rybozo-5-fosforanu i zredukowanego nukleotydu NADPH. Ryboza i jej pochodne wykorzystywane są do syntezy nukleotydów, które z kolei są wbudowywane w DNA replikowany w dzielących się komórkach. Natomiast NADPH bierze udział w redukcyjnych biosyntezach, takich jak synteza kwasów tłuszczowych, aminokwasów i steroidów [Stryer, 2000]. Ocena nasilenia reakcji histochemicznej wykrywającej działanie dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej pozwala na wnioskowanie o aktywności podziałowej komórek, a tym samym o procesach regeneracji zachodzących w tkankach [Pearse, 1991].

Proces regeneracji wymaga zwiększonego dostępu do energii, która w tkankach zmagazynowana jest w wysokoenergetycznych wiązaniach ATP. Większość energii pochodzącej z procesów katabolicznych organizmu jest dostarczana dzięki aktywności mitochondrialnego łańcucha oddechowego, biorącego udział w procesie fosforylacji oksydatywnej. Łańcuch składa się z transbłonowych kompleksów białkowych zgrupowanych w wewnętrznej błonie mitochondrium. Transportują one elektrony pochodzące z nukleotydów NADH lub FADH2 wzdłuż kolejnych ogniw łańcucha, działając przy tym jako pompy protonowe. Elektrony pochodzące z NADH są wprowadzane na łańcuch oddechowy na poziomie dehydrogenazy NADH, kończą zaś swoją drogę za pośrednictwem oksydazy cytochromu c (OCC), która przekazuje elektrony z ferrocytochromu c na tlen cząsteczkowy (akceptor końcowy). Ponieważ jest to jedyna w łańcuchu reakcja nieodwracalna, to ona nadaje kierunek dla przemieszczania się czynników redukujących i sprzężonej z nim syntezy ATP. Oksydaza cytochromowa ma bardzo duże powinowactwo do tlenu, dzięki czemu łańcuch oddechowy pracuje aż do całkowitego wykorzystania tlenu znajdującego się w tkance [Stryer, 2000; Murray i wsp., 1998].

Oksydaza cytochromowa występuje w mitochondriach wszystkich komórek organizmów tlenowych. Histochemiczna demonstracja oksydazy cytochromowej jest użyteczna w badaniach naukowych do wykazania populacji funkcjonalnie aktywnych komórek. Oksydaza cytochromu c jest enzymem bardzo wrażliwym, wszelakie zaburzenia środowiska znajdują natychmiast odzwierciedlenie w obniżeniu lub nawet zahamowaniu aktywności tego enzymu. Aktywność oksydazy cytochromu c jest więc doskonałym indykatorem własności cytotoksycznych wszczepionego materiału.

W procesach przebudowy tkanki kostnej istotną rolę odgrywa aktywność alkalicznej (zasadowej) fofatazy (FA). Fosfataza zasadowa to nazwa grupy enzymów lizosomalnych, które katalizują hydrolizę wiązania fosforoestrowego w środowisku zasadowym. Enzym ten występuje wprawdzie w komórkach wszystkich tkanek, ale szczególnie aktywny jest w komórkach kościotwórczych, jest więc uznawany za enzym markerowy osteoblastów. FA odgrywa istotną rolę w procesie mineralizacji kości [Piatelli i wsp.,1995].

5. Stan zapalny towarzyszący implantacji biomateriału.

Implantacja jakiegokolwiek materiału zawsze wywołuje odpowiedź immunologiczną organizmu. Początkowo jest to odpowiedź nieswoista, związana z samym zabiegiem

chirurgicznym. Dopiero w następnym etapie staje się odpowiedzią na wszczepione ciało obce. Nasilenie tej odpowiedzi zależne jest od użytego materiału. Wiadomo, że oprócz innych

właściwości implantu, na nasilenie odpowiedzi tkankowej mogą wpływać cechy jego powierzchni [Keselowsky i Garcia, 2005], w tym jej rozmiar [Chesmel i Black, 1995]. Właściwości powierzchni decydują m.in. o przyleganiu białek do implantu. Na początku są to białka z osocza krwi, która wylewa się podczas implantacji z uszkodzonych naczyń. Później są to białka substancji międzykomórkowej. Komórki obronne rozpoznają białka zaadsorbowane na powierzchni biomateriału i ulegają adhezji na drodze oddziaływań receptorowych. Na przebieg tego procesu mają wpływ składniki bioaktywne, własności fizykochemiczne biomateriału i środowisko tkankowe [Kao i Lee, 2001]. Sprowokowany implantacją stan zapalny, który jest reakcją tkanek na uszkodzenie i obecność ciała obcego, ma na celu wyeliminowania czynnika uszkadzającego i naprawę zniszczonych tkanek.

W miejscu uszkodzenia tkanek gromadzą się „komórki zapalne": granulocyty, mastocyty, makrofagi, limfocyty, pojawiające się w określonej kolejności. Wśród leukocytów pojawiających się na miejscu jako pierwsze, zdecydowanie dominują neutrofile, których rolą jest walka z czynnikami infekującymi. Obecność tych komórek w tkance, normalnie spotykanych tylko we krwi i szpiku kostnym, świadczy o występującym uszkodzeniu tkanki i/ lub infekcji. Liczebna przewaga neutrofili nad innymi leukocytami jest charakterystyczna dla ostrej fazy zapalenia. Niezależnie od tego, czy rana jest zainfekowana czy nie, proces zapalny i towarzyszący mu napływ neutrofili dominują podczas pierwszej doby. Po 24 godzinach zaczyna wzrastać liczba monocytów/makrofagów, które fagocytują pozostałości neutrofili i produkują cytokiny aktywujące pozostałe komórki, zarówno leukocyty, jak i fibroblasty, komórki epidermalne oraz endotelialne [Maśliński i Ryżewski,1998]. Proces regeneracji zaczyna się w 2-3 dniu od momentu uszkodzenia tkanki. Istotny wpływ na przebieg tego procesu mają również mastocyty i eozynofile, które pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanki. Mimo, że wiele już wiadomo o funkcjach tych komórek, wciąż nie są one do końca poznane i nadal są przedmiotem badań.

Komórki tuczne (mastocyty), cechujące się obecnością dużych zasadochłonnych ziarnistości, występują zwłaszcza w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, limfatycznych i nerwów [Jakóbisiak, 2000]. Wydzielają olbrzymią ilość czynników modulujących przebieg stanu zapalnego, w tym: aminy biogenne, pochodne kwasu arachidonowego, cytokiny i chemokiny. Substancje te wydzielane są na drodze degranulacji przez aktywowane komórki [Cichocki i wsp., 1998]. Aktywacja mastocytów może być wywołana przez niespecyficzne bodźce, w tym przez miejscowe uszkodzenie tkanki. Mastocyty biorą udział w procesach

odporności wrodzonej, obronie przed czynnikami infekcyjnymi, immunomodulacji układu odpornościowego oraz w procesach angiogenezy i naprawy tkanek. W ziarnistościach

mastocytów magazynowana jest histamina o działaniu prozapalnym i chemotaktycznym (działająca m.in. na eozynofile), oraz peptydowe czynniki chemotaktyczne dla granulocytów kwasochłonnych i obojętnochłonnych [Ptak i Ptak, 1999]. Przypuszcza się, że substancje wydzielane przez mastocyty, zwłaszcza histamina, odgrywają kluczową rolę w rekrutacji komórek fagocytujących w odpowiedzi na wszczepiony biomateriał [Tang i wsp., 1998]. Do mediatorów wydzielanych w wyniku pobudzenia komórki należą prostaglandyny, leukotrieny i czynnik aktywujący płytki (ang. Platelet Activating Factor, PAF), który działa chemotaktycznie i aktywująco na neutrofile, eozynofile i monocyty [Jakóbisiak, 2000].

Istotnym produktem mastocytów jest polipeptyd o nazwie basic fibroblast growth factor (bFGF) - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, wykazujący właściwości angio- i mitogenne. Poprzez czynniki uwalniane z ziarnistości mastocyty wywierają silny efekt proliferacyjny na fibroblasty. Mastocyty i fibroblasty oddziałują wzajemnie na siebie, w różnorodny sposób wpływając na swoją aktywność biologiczną.

W specjalnej relacji z mastocytami znajdują się eozynofile, przyciągane przez czynnik chemotaktyczny wydzielany przez mastocyty. Jedną z funkcji eozynofili jest kontrola aktywności komórek tucznych.

Eozynofile - granulocyty kwasochłonne, mają zdolność działania cytotoksycznego poprzez produkcję białek cytotoksycznych i wolnych rodników tlenowych [Jakóbisiak, 2000].

W początkowych etapach stanu zapalnego mają funkcję podobną do neutrofili – zabijają i fagocytują drobnoustroje, a w późnych fazach gojenia dostarczają dodatkowych czynników wzrostowych. Są zaangażowane w procesy odpowiedzi odpornościowej, procesy angiogenezy oraz gojenia ran.

Eozynofile mogą ulegać degranulacji, wydzielając zawartość ziarnistości do przestrzeni międzykomórkowych, co umożliwia likwidację dużych, nie dających się sfagocytować obiektów przez rozpuszczanie [Roitt, 2000]. Do czynników pobudzających aktywność granulocytów kwasochłonnych i hamujących ich apoptozę, a więc wpływających na przedłużenie stanu zapalnego, należą, produkowane przez mastocyty: interleukina 5 (IL-5) oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) [Krishnaswamy i wsp., 2002]. Zgodnie z nazwą, GM-CSF wpływa dodatnio na rozwój komórek należących do linii granulocytarnej i makrofagowej, ponadto zwiększa właściwości fagocytarne, wytwarzanie innych cytokin i ekspresję niektórych cząsteczek powierzchniowych na dojrzałych komórkach [Zangrilli, 2002]. Z kolei czynniki uwalniane przez eozynofile, histaminaza i sulfataza arylowa,

inaktywują produkty wydzielane przez komórki tuczne, histaminę i leukotrieny siarczkowe (LTC4, LTD4, LTE4). Powoduje to stłumienie odpowiedzi zapalnej [Roitt, 2000]. Poza działaniem enzymatycznym na produkty mastocytów eozynofile wydzielają substancje hamujące uwalnianie histaminy z mastocytów [Jakóbisiak, 2000].
Wśród różnorodnych funkcji mastocytów i eozynofili najistotniejszy w naszym przypadku wydaje się ich wpływ na fibroblasty oraz angiogenezę. W odpowiedzi na wydzielone czynniki wzrostowe fibroblasty migrują w kierunku miejsca wszczepu, proliferują oraz produkują kolagen i proteoglikany. Zwiększająca się masa fibroblastów zaczyna tworzyć tkankę ziarninową przekształcającą się w tkankę łączną włóknistą zawierającą naczynia krwionośne. Proces ten prowadzi do zabliźnienia rany.

Dla przebiegu stanu zapalnego istotna jest obecność makrofagów. Makrofagi uczestniczą zarówno w odpowiedzi wrodzonej nieswoistej, jak i w odporności swoistej. Biorą udział w niszczeniu czynników infekcyjnych, własnych nieprawidłowych komórek oraz uprzątaniu obumarłych resztek tkankowych. Produkują reaktywne związki tlenowe, mające właściwości bakteriobójcze: nadtlenek wodoru, rodniki hydroksylowe i tlenek azotu. Należą do układu komórek prezentujących antygen limfocytom, wydzielają liczne czynniki regulujące odpowiedź immunologiczną i same są wrażliwe na czynniki prozapalne wydzielane przez inne komórki [Jakóbisiak, 2000].

Makrofagi w warunkach przewlekłej stymulacji cytokinami w obecności ciała obcego, ulegają fuzji w wielojądrowe komórki olbrzymie zwane komórkami około ciała obcego [Ptak i Ptak, 1999]. Obecność wielojądrowych komórek olbrzymich świadczy o procesach degradacji biomateriału i może przyczynić się do ich przyspieszenia. Jest również objawem przewlekłego stanu zapalnego, wywołanego obecnością ciała obcego, którego komórki nie są w stanie sfagocytować [Kao i Lee, 2001].
Jako wyspecjalizowane fagocyty, makrofagi charakteryzują się wysoką aktywnością enzymów hydrolitycznych, szczególnie kwaśnej fosfatazy i esterazy niespecyficznej, zawartych w licznych lizosomach.

Lizosomy są organellami, w których wielkocząsteczkowe związki rozkładane są na proste substancje, do ponownego wykorzystania przez komórkę. Zawierają enzymy należące do trzech grup hydrolaz: esterazy, glikozydazy i peptydazy. Hydrolazy: kwaśna fosfataza oraz esteraza niespecyficzna są enzymami markerowymi lizosomów i jednocześnie monocytów i makrofagów.

Esteraza niespecyficzna (kwaśna esteraza α-naftylu; EN) to w rzeczywistości trzy grupy hydrolaz estrów: karboksyloesterazy, aryloesterazy i acetyloesterazy. Mają one zdolność hydrolizy syntetycznych substratów estrowych, natomiast ich naturalne substraty w większości są nie poznane [Pearse, 1991]. Esteraza α-naftylu jest enzymem lizosomalnym, którego obecność można wykazać histochemicznie w monocytach i limfocytach T [Kiernan, 1992].

Kwaśna fosfataza (FK) występuje w dużych stężeniach między innymi w fagocytach i komórkach ulegających degeneracji [Pearse, 1991]. Jej rola polega głównie na katalizowaniu defosforylacji różnych estrów fosforanowych. Wartość pH dla optymalnego działania fosfatazy kwaśnej mieści się w zakresie od 3,4 do 6,2.

W przypadku tkanki kostnej istotne jest rozróżnienie kwaśnej fosfatazy aktywnej w komórkach uczestniczących w przebudowie kości – osteoklastach od winianoopornej kwaśnej fosfatazy (ang. Tartar Resistant Acid Phosphatase, TRAP). Termin "kwaśna fosfataza" obejmuje całą grupę hydrolaz lizosomalnych, które katalizują w środowisku kwaśnym reakcję hydrolizy estrów fosforanowych. Źródłem enzymu mogą być komórki różnych tkanek, potrzebna jest więc specyficzna reakcja, żeby odróżnić fosfatazę aktywną w osteoklastach - komórkach uczestniczących w przebudowie kości, od fosfatazy aktywnej w komórkach układu odpornościowego, uczestniczących w wywołaniu stanu zapalnego. Pomocna jest tu metoda immunohistochemiczna, gdzie przeciwciała łączą się specyficznie z izomerami kwaśnej fosfatazy charakterystycznymi wyłącznie dla osteoklastów. W klasycznej histochemii wykorzystuje się właściwości kwasu winowego, który blokuje aktywność większości izomerów kwaśnej fosfatazy, pozostawiając aktywnymi izomery enzymu występującego w osteoklastach [Kiernan, 1992].

Wysoka aktywność enzymów lizosomalnych świadczy o procesach degeneracji i przebudowy struktur komórkowych i tkanek oraz intensywnej fagocytozie [Cichocki i wsp., 1998]. Elementy tkanki łącznej, na terenie której toczy się stan zapalny, są trawione przez enzymy wydzielane z komórek. Jednocześnie jednak nasila się aktywność jej komórek, głównie fibroblastów, które syntetyzują nowe składniki istoty międzykomórkowej. Stan zapalny powoduje też stały napływ komórek obronnych. W rezultacie w miejscu zranienia powstaje tkanka ziarninowa, na którą składają się elementy tkanki łącznej (fibroblasty, składniki macierzy międzykomórkowej), powstające naczynia krwionośne oraz komórki obronne. W miarę eliminowania czynników, które wywołały stan zapalny zmienia się skład tkanki ziarninowej, która zawiera coraz mniej elementów komórkowych, a coraz więcej

wytwarzanych przez fibroblasty włókien kolagenowych [Damjanow i McCue, 1996]. W efekcie takiego procesu powstaje blizna, która nie odtwarza właściwości tkanki, na miejscu której powstała. Stąd tak duże znaczenie przypisuje się materiałom bioaktywnym, które mają nie tylko wypełnić ubytek i inicjować procesy naprawcze, ale przede wszystkim stymulować i ukierunkowywać regenerację tkanki, która uległa uszkodzeniu.

CEL PRACY

Badania *in vivo* bioszkieł wyprodukowanych w Katedrze Szkła i Ceramiki AGH przeprowadzono dwuetapowo. Badania wstępne miały na celu potwierdzenie w warunkach *in vivo* biokompatybilności materiałów, którą stwierdzono wcześniej w badaniach *in vitro* [Łączka-Osyczka i wsp., 1997]. Należy pamiętać, że badania *in vitro*, przeprowadzane na liniach komórkowych, ze względu na bardzo duże uproszczenie środowiska, nie dają nigdy pełnej informacji o biologicznych właściwościach materiału [Lotze, 1999]. Celem badań było określenie charakteru odpowiedzi komórkowej tkanek mięśnia szkieletowego szczura na wprowadzone wszczepy biomateriałów szklistych i szkło-ceramicznych oraz stopnia biozgodności tkankowej tych materiałów.

Ponadto, celem I części eksperymentu było wybranie spośród testowanych materiałów, materiału najlepiej rokującego do dalszych badań. Mimo że materiały te były przeznaczone do wypełniania ubytków kostnych, wszczepiano je najpierw do tkanki mięśniowej. Mięsień szkieletowy szczura wybrano jako model do badań ze względu na to, że materiał zastępujący kość będzie w kontakcie nie tylko z tkanką kostną, ale także z otaczającymi ją tkankami miękkimi, których odpowiedź immunologiczna jest ostrzejsza niż w przypadku tkanki kostnej [Ooms i wsp., 2003]. Nie bez znaczenia był też wzgląd ekonomiczny: badania na tkankach miękkich małych zwierząt są łatwiejsze do przeprowadzenia i przede wszystkim, dużo tańsze. Ich celem było wyselekcjonowanie do dalszych badań najbardziej obiecującego materiału.

Celem II etapu badań była ocena i porównanie *in vivo* procesu regeneracji i reakcji tkankowych na wypełnienie ubytku kostnego u królików materiałem bioaktywnym (wybranym na podstawie wcześniejszych badań bioszkłem Sz2) i materiałem inertnym (SiO_2). Przeprowadzone obserwacje zmian czynnościowych i morfologicznych, zachodzących w środowisku tkankowym pod wpływem wszczepionych biomateriałów, pozwoliły ocenić przydatność bioaktywnej ceramiki Sz2 w leczeniu ubytków kostnych. W badaniach zwracano szczególną uwagę na bioaktywność materiału, ze względu na to, że ma on pełnić funkcje nie tylko rusztowania dla komórek, ale dodatkowo ma pobudzać układ odpornościowy i następnie regenerację tkanek.

Materiały i metody

MATERIAŁY I METODY

1. Badania wstępne w tkance mięśniowej.

1.1. Materiały.

Bioszkła czterech typów oznaczone symbolami: Sz2, A2, RM i RMC zsyntetyzowano w Katedrze Technologii Szkła i Powłok Amorficznych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie.

Składy chemiczne szkieł Sz2 i A2 stanowią skrajne, z punktu widzenia zachowania właściwości bioaktywnych, syntezy w obszarze układu CaO-SiO_2-P_2O_5, zapewniające jeszcze otrzymanie materiału bioaktywnego, ale o maksymalnie zróżnicowanych właściwościach.

Szkło RM posiada skład chemiczny odpowiadający pierwszemu bioaktywnemu szkłu Hencha i stanowi materiał kontrolny dla pozostałych bioszkieł, szkło RMC posiada w stosunku do szkła Hencha skład zmodyfikowany w kierunku zwiększenia zdolności szkła do krystalizacji oraz zmniejszenia aktywności chemicznej. Składy chemiczne badanych szkieł zestawiono w tabeli (Tab.2).

Tabela 2. Składy chemiczne szkieł zastosowanych w badaniach.

Symbol szkła	**Zawartość składnika w % mol.**					
	CaO	**P_2O_5**	**SiO_2**	**Na_2O**	**MgO**	**CaF_2**
Sz2	16	4	80	-	-	-
A2	54	6	40	-	-	-
RM	26,91	2,6	46,14	24,35	-	-
RMC	51,32	6,04	34,65	-	7,6	0,4

W celu otrzymania szkieł o podanych w Tabeli 2. składach zastosowano dwie metody – chemiczną metodę zol-żel oraz klasyczny sposób topienia i kierowanej krystalizacji. Metodę zol-żel zastosowano w odniesieniu do składów Sz2 i A2, metodę topienia – w odniesieniu do składów RM i RMC. W wyniku syntez uzyskano amorficzne materiały

w postaci nieregularnych ziaren, z których wydzielono frakcję ziarnową o wielkości zawartej w przedziale 0,5-0,8 mm.

1.2. Zwierzęta.

Badania, za zgodą Uczelnianej Komisji Etycznej UJ, przeprowadzono na dorosłych szczurach rasy Hooded Oxford (HO/Krf), pochodzących z hodowli zwierzętarni eksperymentalno-hodowlanej Wydziału Farmaceutycznego CM UJ. Do momentu rozpoczęcia doświadczenia i w trakcie jego trwania, zwierzęta przebywały w zwierzętarni w warunkach standardowych: stałej temperatury (ok. 20ºC) i oświetlenia (cykl dobowy 12/12 godzin), były żywione znormalizowaną, pełnowartościową mieszanką granulowaną i pojone wodą wodociągową *ad libitum*.

1.3. Implantacja.

Takie same porcje badanych biomateriałów wszczepiano do mięśnia szkieletowego pośladkowego dorosłych, 4-miesięcznych szczurów. W grupie doświadczalnej utworzono serie 2, 7, 30, 90, 150 i 180-dniowe po 12 osobników (6 samic i 6 samców). W grupie kontrolnej utworzono tylko serie 2, 7 i 30-dniowe (ze względu na szybkie zakończenie procesu gojenia).

W celu wykonania zabiegu zwierzętom podawano dootrzewnowo Vetbutal w dawce 60 mg/kg masy ciała zwierzęcia. Po uśpieniu zwierzęcia, poprzez odkażenie i usunięcie sierści przygotowywano pole operacyjne. Następnie nacinano powłoki skórne i mięsień pośladkowy zwierzęcia. Do nacięcia w mięśniu, o głębokości ok. 0,4 cm, wprowadzano 0,3 g sterylnego biomateriału.

1.4. Przygotowanie materiału tkankowego do badań.

Po upływie 2, 7, 30, 90, 150 lub 180 dni szczury z danej serii były zabijane przez dekapitację. W serii 2-dniowej w rozmazach wykonanych metodą odbitkową z miejsca wszczepu, barwionych metodą Pappenheima, liczono udział procentowy poszczególnych typów leukocytów w 200 kolejno napotkanych komórkach.

Z pozostałych serii pobierano wycinki tkankowe z miejsc wszczepów wraz z najbliższą okolicą i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Zamrożone wycinki skrawano na mikrotomie kriostatowym (Pearse-Slee) na skrawki o grubości od 8 do 12 μm, które następnie poddano procedurom histologicznym i histochemicznym.

2. Badania w tkance kostnej.

2.1. Materiały.

Wstępne badania przeprowadzone na tkankach miękkich szczurów pozwoliły na wytypowanie do dalszych badań materiału o najbardziej obiecujących właściwościach. Również z wcześniejszych badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wynika, że szkło Sz2 w formie granul wykazuje właściwości biozgodne i bioaktywne [Łączka i wsp., 2003]. Bioszkło Sz2 (Fig.1) z układu $CaO\text{-}SiO_2\text{-}P_2O_5$ i chemicznie czyste, amorficzne szkło krzemionkowe v-SiO_2 (Fig.2) zsyntetyzowano w Katedrze Technologii Szkła i Powłok Amorficznych Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Materiał S2 otrzymano metodą zol-żel przy temperaturze obróbki termicznej nieprzekraczającej zwykle 800^{o}C, zgodnie z metodą opisaną poprzednio [Łączka i Cholewa, 1997]. W wyniku syntez uzyskano amorficzny materiał w postaci nieregularnych ziaren, z których wydzielono frakcję ziarnową 0,5-0,8 mm. Szkło krzemionkowe, uzyskane metodą tradycyjnego topienia, ze względu na niską aktywność chemiczną zostało użyte jako materiał kontrolny.

Fig.1 Granule bioszkła Sz2 A) w mikroskopie optycznym (pow. obiektywu 10x) i B) w elektronowym mikroskopie skaningowym.

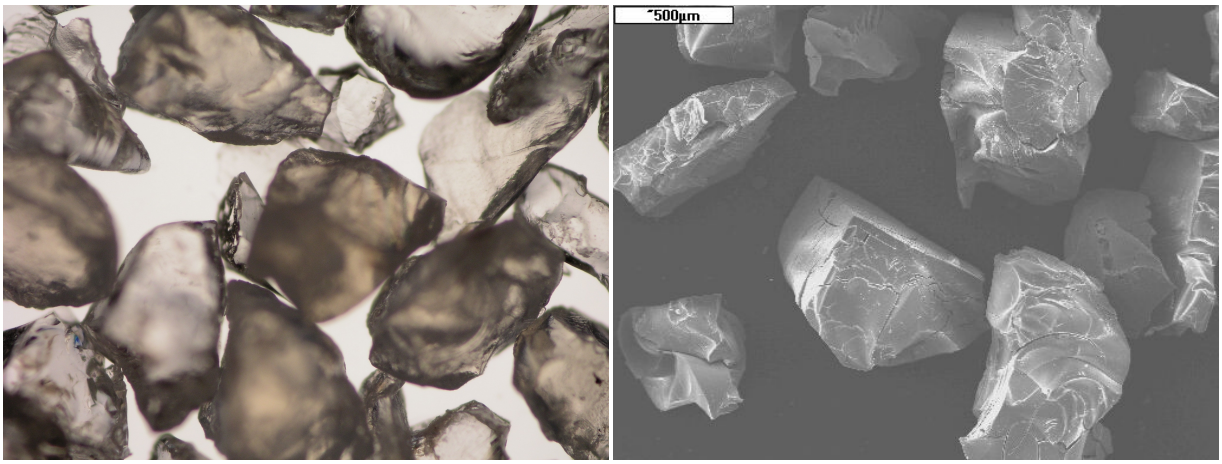
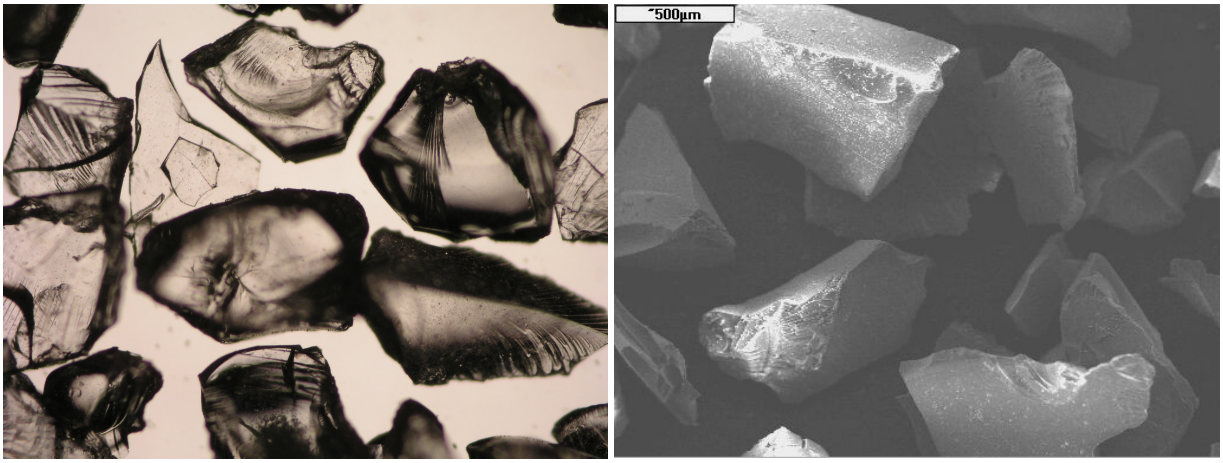


Fig.2. Granule szkła krzemionkowego v-SiO_2 A) w mikroskopie optycznym (pow. obiektywu 10x) i B) w elektronowym mikroskopie skaningowym.



2.2. Zwierzęta.

Badania (za zgodą Senackiej Komisji ds. Etyki i Nadzoru Doświadczeń na Zwierzętach w Łodzi, nr licencji 020) przeprowadzono na 50 osobnikach królików rasy mieszanej o średniej wadze 3650g. Wszystkie zwierzęta pochodziły z hodowli prowadzonej w zwierzętarni Akademii Medycznej w Łodzi. Zwierzęta przetrzymywane były w warunkach standardowych, ze swobodnym dostępem do paszy i wody.

2.3. Implantacja.

Jednakowe ilości materiałów Sz2 i v-SiO_2 (0,5cm^3) wszczepiano do, operacyjnie wykonanego w kości promieniowej przedniej kończyny, ubytku o rozmiarach 20mm x 5mm x 5mm. Każde ze zwierząt otrzymało dwa implanty: do kości prawego przedramienia Sz2 i do lewego v-SiO_2. Zabieg przeprowadzono w warunkach aseptycznych i pod narkozą. Zwierzęta podzielono na grupy w zależności od długości trwania eksperymentu: serie 3, 7, 21, 42 i 90-dniowe .

2.4. Przygotowanie materiału tkankowego do badań.

Po upływie czasu danej serii zwierzęta zabijano jednorazową dawką śmiertelną Vetbutalu. Natychmiast po zabiciu izolowano fragment kości wraz z implantem. Połowę wyciętego fragmentu zamrażono w suchym lodzie dwutlenkowym, a drugą połowę utrwalano w buforowanej 4% formalinie. Zamrożone wycinki skrawano w temperaturze –30^oC przy

pomocy mikrotomu kriostatowego (Pearse-Slee) na skrawki tkankowe o grubości od 10 do 15μm w celu przeprowadzenia reakcji histologicznych i histochemicznych. Pozostałe wycinki kostne poddano procedurze, prowadzącej do uzyskania skrawków parafinowych:

1. Wycinki utrwalano - 2 tygodnie.
2. Płukano w wodzie bieżącej - 24 godziny.
3. Odwapniano roztworem TBD-1 Decalcifier *(*Shandon, Anglia).
4. Odwadniano w rosnącym szeregu stężeń alkoholu etylowego (50, 70, 90, 96, 2 x 100%) – każdy 24 godziny.
5. Prześwietlono w dwóch zmianach ksylenu – 2 x 30 minut.
6. Zatapiano w parafinie.
7. Przygotowane bloczki parafinowe skrawano na mikrotomie Leica na skrawki tkankowe o grubości 10 μm, na których następnie przeprowadzano reakcje histologiczne.

3. Metody histologiczne.

3.1. Barwienie panchromatyczne metodą Pappenheima [Zawistowski, 1986].

Procedura:

1. Skrawki kriostatowe suszono na powietrzu – ok. 2 godziny.
2. Pokrywano barwnikiem May – Grünwalda - 3 minuty.
3. Barwnik rozcieńczono na szkiełku wodą destylowaną w proporcji 1:1 - 2 minuty.
4. Barwnik zlewano ze szkiełka.
5. Barwiono barwnikiem Giemsy rozcieńczonym wodą destylowaną w stosunku 1 : 9 przez 20 minut.
6. Płukano wodą bieżącą, a następnie wodą destylowaną.
7. Suszono na powietrzu - 24 godziny.
8. Preparaty zamykano w syntetycznym medium DPX.

Na skrawkach barwionych tą metodą w miejscu implantacji obserwowano rozwój tkanki ziarninowej i obecność komórek biorących udział w procesie zapalnym. Wynikiem reakcji jest różowe zabarwienie ziarnistości granulocytów kwasochłonnych i fioletowe zabarwienie ziarnistości komórek tucznych. Komórki olbrzymie uzyskują zabarwienie niebieskie z widocznymi na obwodzie ciemnoniebieskimi jądrami komórkowymi. Włókna kolagenowe i fibryna barwią się na kolor różowy.

3.2. Trójchromatyczne barwienie Massona – Goldnera [Goldner, 1938].

Procedura:

1. Skrawki parafinowe odparafinowano i nawodniono poprzez przeprowadzenie kolejno przez:
   - ksylen I, II – 2 x 10 minut,
   - alkohol 100%, 90%, 70%, 50% - w każdym po 10 minut.
2. Płukano w wodzie destylowanej - 5 minut.
3. Barwiono hematoksyliną żelazistą Weigerta – 10 minut.
4. Płukano w wodzie bieżącej – 5 minut.
5. Płukano w 1% kwasie octowym – 30 sekund.
6. Barwiono azofloksyną– 10 minut.
7. Płukano w 1% kwasie octowym – 30 sekund.
8. Barwiono oranżem G – 5 minut.
9. Płukano w 1% kwasie octowym – 30 sekund.
10. Barwiono zielenią świetlistą (Light Green SF) – 4 minuty.
11. Odwodniono poprzez przeprowadzenie przez rosnące stężenia roztworów alkoholu:
    - 70%, 90%, 100% - każde po 5 minut,
    - i dwie zmiany ksylenu – 2 x 5 minut.
12. Zamykano w syntetycznym medium DPX.

Metoda barwienia trójchromatycznego wg. Massona i Goldnera umożliwia różnicowe barwienie tkanki łącznej i mięśni. Stosowana jest standardowo do obrabianych próbek (utrwalonych – najlepiej buforowaną formaliną i zatapianych w parafinie).

Wynikiem barwienia jest pomarańczowe zabarwienie włókien mięśniowych, zielone – włókien kolagenowych, jaskrawoczerwone - erytrocytów i ciemnobrązowe - jąder komórkowych. Tkanka kostna zmineralizowana zabarwiona jest na kolor niebieski, osteoid – czerwony.

4. Metody histochemiczne.

Histochemia jest metodą łącznego badania struktury i metabolizmu tkanki. Pozwala na wykrywanie w tkankach specyficznych substancji (np. białek, węglowodanów, kwasów nukleotydowych, jonów metali). Odrębny dział histochemii zajmuje się wykrywaniem aktywności enzymatycznej tkanek i poszczególnych komórek.

Enzymy, których aktywność badano w niniejszej pracy należą do klasy oksydoreduktaz i hydrolaz.

Oksydoreduktazy (m.in. dehydrogenazy i oksydazy), katalizujące reakcje utleniania i redukcji, pełnią wiele ważnych funkcji, m.in. w procesach przemian energii (łańcuch oddechowy) i odtruwaniu organizmu (biotransformacja ksenobiotyków).

Hydrolazy są enzymami aktywnymi w komórkach uczestniczących w rozwoju stanu zapalnego, ale i przy inicjowaniu procesów regeneracyjnych. Fosfataza kwaśna i esteraza niespecyficzna są enzymami markerowymi komórek stanu zapalnego (głównie monocytów i makrofagów), fosfataza alkaliczna jest enzymem charakterystycznym dla komórek kościotwórczych - osteoblastów.

4.1. Dehydrogenaza glukozo-6-fosforanowa (G6PDH) EC 1.1.1.49 [Pearse,1972].

Medium inkubacyjne:

1. W 5 ml wody destylowanej rozpuszczono 167 mg soli sodowej glukozo-6-fosforanu.
2. Do powstałego roztworu dodano:
   - 1,25 ml buforu Tris (pH 7,19),
   - 1,25 ml roztworu NBT (1 mg/ml),
   - 0,5 ml roztworu chlorku magnezu (0,05 M),
   - 0,5 ml roztworu azydku sodu (0,1 M),
   - 0,25 ml roztworu fluorku sodu (0,01 M).
3. Dodano NADP (q. s.) i adjustowano do pH 7,2 0,2 M roztworem Tris.

Procedura:

1. Świeże skrawki tkankowe pokryte medium inkubowano w temperaturze 37°C - 30 minut.
2. Płukano wodą destylowaną – 30 sekund.
3. Skrawki pokryto formaliną solankową - 5 minut.
4. Płukano wodą destylowaną – 30 sekund.
5. Zamykano w glicerożelatynie na szkiełkach podstawowych.

Wynikiem zastosowanej reakcji histochemicznej jest niebieskie zabarwienie miejsc aktywności enzymu.

4.2. Dehydrogenaza NADH (NADHDH) EC 1.6.99.3 [Pearse, 1972].

Medium inkubacyjne:

1. Zmieszano:
   - 2,5 ml roztworu NBT (1 mg/ml),
   - 4,4 ml wody destylowanej,
   - 2,5 ml buforu Tris o pH 8,05.
2. Dodano koenzym NADH (q.s.).
3. Ustalono pH na poziomie 7,2 - 7,4 za pomocą roztworu 1 M HCl.

Procedura:

1. Świeże skrawki tkankowe pokryte medium inkubowano w temperaturze 37°C - 30 minut.
2. Płukano wodą destylowaną.
3. Skrawki pokryto formaliną solankową - 5 minut.
4. Płukano wodą destylowaną.
5. Zamykano w glicerożelatynie na szkiełkach podstawowych.

Miejsca aktywności enzymu uzyskują w wyniku zastosowania opisanej metody niebieskie zabarwienie.

4.3. Oksydaza cytochromu c (OCC) EC 1.9.3.1 [Burstone, 1962].

Medium inkubacyjne:

1. Roztwór A: 5 mg błękitu wariaminowego i 5 mg p-amino-difenyloaminy rozpuszczono w 0,25 ml etanolu 96 %.
2. Roztwór B: zmieszano 17,5 ml wody destylowanej i 7,5 ml buforu Tris o pH 7,36.
3. Roztwory A i B połączono, następnie filtrowano.
4. Dodano cytochrom c do uzyskania barwy ceglastej (ok. 5 mg).

Procedura:

1. Świeże skrawki kriostatowe inkubowano w medium w temperaturze pokojowej - 30 minut.
2. Płukano w wodzie wodociągowej, a następnie wodą destylowaną.
3. Zamykano glicerożelem na szkiełkach podstawowych.

Miejsca aktywności oksydazy cytochromowej mają brązowe zabarwienie.

4.4. Fosfataza kwaśna (FK) EC 3.1.3.2 [Goldberg i Barka, 1962].

Medium inkubacyjne:

1. Roztwór A:
   - 6 kropli 4% roztworu pararozaniliny połączono z 6 kroplami 4% roztworu azotynu sodu,
   - po minucie dodano 30 ml buforu weronalowo-octanowego o pH 7,6,
   - doprowadzono do pH 5,0 - 5,1 2 N kwasem solnym.
2. Roztwór B: 10 mg fosforanu AS-BI naftolu rozpuszczono w 1 ml N,N-dimetyloformamidu.
3. Połączone roztwory A i B filtrowano.

Procedura:

1. Skrawki tkankowe suszono na powietrzu – 2 godziny.
2. Inkubowano w roztworze A+B w temperaturze 37^{o}C - 30 minut.
3. Płukano w wodzie destylowanej.
4. Barwiono hematoksyliną Mayera - 5 minut.
5. Płukano w wodzie wodociągowej – 10 minut.
6. Płukano wodą amonową - 5 minut.
7. Zamykano w glicerożelatynie na szkiełkach podstawowych.

Wynikiem reakcji jest czerwone zabarwienie miejsc aktywności enzymu, jądra komórkowe zabarwione są na kolor ciemnoniebieski.

4.5. Esteraza niespecyficzna (kwaśna esteraza alfa-naftylu EN) EC 3.1.1.1 [Kiernan, 1990].

Medium inkubacyjne:

1. Rozpuszczono 200 mg octanu α-naftylu w 10 ml acetonu.
2. Sporządzono 4 % wodny roztwór azotynu sodu.
3. W 50 ml 2 M kwasu solnego rozpuszczono 2,0 g pararozaniliny.
4. Połączono równe objętości (1,2 ml) roztworu pararozaniliny i roztworu azotynu sodu.
5. Po minucie dodano do mieszaniny 40 ml buforu fosforanowego o pH 5,0 oraz 0,5 ml roztworu octanu α-naftylu.
6. Doprowadzono do pH 5,8 przez dodanie 1,0 M NaOH i przefiltrowano.

Procedura:

1. Skrawki tkankowe suszono na powietrzu – 2 godziny.
2. Inkubowano w roztworze A+B w temperaturze pokojowej - 30 minut.
3. Płukano w wodzie destylowanej.
4. Barwiono hematoksyliną Mayera - 5 minut.
5. Płukano w wodzie wodociągowej.
6. Pokryto wodą amonową - 5 minut.
7. Zamykano w glicerożelatynie na szkiełkach podstawowych.

Rejony aktywności enzymu są zabarwione na czerwono (pozytywne monocyty i limfocyty T), jądra komórek - na kolor ciemnoniebieski.

4.6. Kwaśna fosfataza winianooporna TRAP (ang. Tartare Resistant Acid Phosphatase) EC 3.1.3.2 [Kiernan, 1990].

Medium inkubacyjne:

1. Roztwór A:

- wymieszano 6 kropli 4% pararozaniliny i 6 kropli 4% azotynu sodu – 1 minuta,
- po minucie dodano 30 ml buforu weronalowo-octanowego o pH 7,6.

2. Roztwór B:

- rozpuszczono 10,0 mg fosforanu ASB-I naftolu w 1,0 ml N,N-dimetyloformamidu.

3. Połączono roztwory A i B.
4. Dodano winian sodu w ilości 28mg/10ml mieszaniny roztworów.
5. Całość wymieszano i przefiltrowano.

Procedura:

1. Skrawki kriostatowe wysuszono na powietrzu – 2 godziny.
2. Inkubowano w medium w temp. 37^{o}C – 1 godzina.
3. Płukano w wodzie destylowanej – 30 sekund.
4. Barwiono hematoksyliną Mayera -5 minut.
5. Płukano wodą bieżącą – 10 minut.
6. Zanurzono w wodzie amonowej - 5 minut.
7. Płukano w wodzie destylowanej – 30 sekund.
8. Zamykano na szkiełkach podstawowych w glicerożelu.

Dodatek do mieszaniny inkubacyjnej kwasu winowego (w postaci np. winianu sodu) hamuje działanie większości izozymów kwaśnej fosfatazy nie będąc jednocześnie inhibitorem TRAP. Reakcja ta jest selektywna przede wszystkim dla aktywnych osteoklastów zawierających fosfatazę kwaśną winianooporną.

Rezultat: miejsca aktywności kwaśnej fosfatazy winianoopornej (TRAP) przyjmują kolor czerwony.

4.7. Fosfataza alkaliczna (FA) EC 3.1.3.1 [Kiernan, 1990].

Medium inkubacyjne:

1. Do 10,0 ml 0,05M buforu TRIS o pH 10,0 dodano
   - 10,0 mg soli sodowej fosforanu α-naftylu,
   - 10,0 mg sześciowodny chlorek magnezu,
   - 10,0 mg fast blue RR.
2. Składniki razem wymieszano i przefiltrowano.

Procedura:

1. Skrawki kriostatowe wysuszono na powietrzu – 2 godziny.
2. Inkubowano w przygotowanym medium - 20 minut.
3. Płukano w wodzie destylowanej - 1 minuta.
4. Zanurzono w 1% kwasie octowym - 1 minuta.
5. Płukano w wodzie destylowanej – 30 sekund.
6. Zamykano w glicerożelu na szkiełku podstawowym.

Miejsca aktywności enzymu zabarwione na kolor purpurowy do czarnego.

4.8. Kolagen - reakcja van Giesona [Bagiński,1965].

Procedura:

1. Skrawki kriostatowe wysuszono na powietrzu.
2. Barwiono roztworem hematoksyliny żelazistej Weigerta – 5 minut.
3. Płukano w wodzie destylowanej – 5 minut.
4. Barwiono w roztworze pikrofuksyny (nasycony wodny roztwór kwasu pikrynowego 90,0 ml + 1% fuksyna kwaśna 10,0 ml) - 15 minut.
5. Szybko opłukano w wodzie destylowanej - ok. 15 sekund.
6. Odwadniano kolejno w alkoholach 90%, 96%, 100% - każdy po 10 minut.
7. Zanurzono w dwóch zmianach ksylenu – 2 x 10 minut.

8. Zamykano w syntetycznym medium DPX (DPX Mountant for histology).

Rezultat: włókna kolagenowe mają kolor jaskrawoczerwony, tkanka mięśniowa, nabłonki - kolor żółty, jądra komórkowe - kolor ciemnobrązowy do czarnego.

4.9. Fibronektyna – reakcja immunohistochemiczna.

W reakcji wykrywającej obecność fibronektyny w tkankach zastosowano poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko fibronektynie (Fibronectin Polyclonal Antibodies, Serotec, UK) i zestaw do wykrywania związanych przeciwciał Antibody Labeling Kit (Serotec, UK).

Procedura:

1. Świeże skrawki kriostatowe suszono na powietrzu.
2. Utrwalano acetonem – 5 minut.
3. Płukano w PBS – 5 minut.
4. Pokryto 1% roztworem H_2O_2 – 5 minut.
5. Płukano w PBS – 5 minut.
6. Pokryto surowicą końską – 5 minut.
7. Strzepnięto surowicę.
8. Inkubowano z przeciwciałem I rzędowym w rozcieńczeniu 1:100 – 1 godzina.
9. Płukano w PBS – 10 minut.
10. Inkubowano z przeciwciałem II rzędowym w rozcieńczeniu 1:500 – 30 minut.
11. Płukano w PBS – 10 minut.
12. Inkubowano z kompleksem awidyna-biotyna-peroksydaza chrzanowa (StreptABCompleks-HRP) – 15 minut.
13. Płukano w PBS – 10 minut.
14. Kompleks przeciwciała + awidyna-biotyna-peroksydaza barwiono inkubując z diaminobenzydyną (DAB) – 15 minut.
15. Płukano w PBS – 10 minut.
16. Zamykano w glicerożelu.

Rezultat: miejsca obecności fibronektyny związanej z przeciwciałami, kompleksem awidyna-biotyna-peroksydaza i DAB wybarwione na kolor ciemnobrązowy. Tło reakcji – kolor jasnobrązowy.

4.10. Reakcja z Alizaryną red S [Kiernan, 1990].

Medium inkubacyjne:

1. Rozpuszczono 1,0 g alizaryny red S w 90 ml wody destylowanej.
2. 28% amoniak rozcieńczono sto razy wodą destylowaną, dodawano kroplami doprowadzając roztwór do pH 6,4.

Procedura:

1. Skrawki kriostatowe wysuszono na powietrzu
2. Następnie barwiono w roztworze A - 2 minuty.
3. Płukano w wodzie destylowanej - 10 sekund.
4. Płukano w roztworze różnicującym (250 ml etanolu 95% i 0,01ml stężonego kwasu solnego) - 15 sekund.
5. Odwadniano w dwóch zmianach alkoholu absolutnego- 2 x 2 minuty.
6. Zanurzono w ksylenie - 5 minut.
7. Zamykano w syntetycznym medium DPX (DPX Mountant for histology).

Jest to selektywna i czuła reakcja na obecność wapnia. Warunki reakcji są tak dobrane, by jony wapnia mogły zostać uwolnione z nierozpuszczalnych depozytów i utworzyć kompleks z barwnikiem. Alizaryna red S tworzy z wapniem kompleks o kolorze pomarańczowym do czerwonego. Tkanki w tle zabarwione są na kolor lekko różowy.

5. Obserwacje mikroskopowe, pomiary morfometryczne i mikrodenzytometryczne.

Obserwacje zostały przeprowadzone za pomocą mikroskopu Olympus BX-41 oraz Olympus CH-2.

Zdjęcia wykonano przy pomocy cyfrowego aparatu fotograficznego Olympus Optical CAMEDIA C-5050.

Pomiary morfometryczne oraz mikrodezytometryczne zostały wykonane za pomocą komputerowego analizatora obrazu mikroskopowego, wyposażonego w kamerę cyfrową ColorView IIIu Soft Imaging System (Olympus, Niemcy) i program Cell D (Olympus, Niemcy).

5.1. Pomiary morfometryczne.

5.1.1. Pomiary liczby leukocytów.

W preparatach barwionych metodą Pappenheima mierzono liczbę mastocytów i eozynofili obecnych na terenie ziarniny, uwzględniając powierzchnię tkanki naprawczej otaczającej wszczep (liczba komórek/mm^2 wszczepu).

5.1.2. Pomiary powierzchni miejsc wykazujących aktywność hydrolaz.

Mierzono powierzchnię obszarów, na których wykazano aktywność enzymów: FA i TRAP i ustalano, jaki stanowią procent całości badanego skrawka tkankowego. Przy analizie brano pod uwagę te obrazy mikroskopowe, w których widoczne były fragmenty wszczepu. Pomiarów dokonano przy powiększeniu obiektywu 20x.

5.1.3. Pomiary stereometryczne.

Do oceny preparatów, w których wykrywano obecność kolagenu (reakcja van Giesona) i wapnia (reakcja z alizaryną) zastosowano metodę stereometryczną. Powierzchnię obszarów wykazujących pozytywną reakcję mierzono przy użyciu siatki stereometrycznej. Siatkę stereometryczną nałożono na obszar obrazu mikroskopowego i zliczano liczbę węzłów siatki, które przypadały na miejsca aktywne.

Obliczenia prowadzono przy powiększeniu obiektywu 20x.

Średnia liczba węzłów przypadających na miejsca aktywne w polu widzenia pozwala na obliczenie procentowe powierzchni aktywnej (przy założeniu, że liczba wszystkich węzłów siatki = 100%) oraz na obliczenie bezwzględnej wartości powierzchni (liczba wszystkich węzłów siatki pokrywającej powierzchnię obrazu odpowiada powierzchni całego pola widzenia).

Przykładowo:

Liczba węzłów siatki całej powierzchni obrazu przy powiększeniu obiektywu 20x = 352

Powierzchnia całego obrazu przy powiększeniu obiektywu 20x = 0,1388 mm^2.

352 węzły (100%) ⟶ 0,1388 mm^2

N węzłów ⟶ x

5.2. Pomiary mikrodenzytometryczne aktywności enzymów.

Intensywność reakcji histochemicznych świadczących o aktywności enzymatycznej tkanek oszacowano za pomocą metody mikrodenzytometrycznej. Metoda ta polega na

pomiarze zintegrowanej gęstości optycznej *(ang Integrated Optical Density*, IOD) obszaru zaznaczonego na obrazie preparatu tkankowego przy użyciu komputerowego analizatora obrazu mikroskopowego [Zieliński i Strzelecki, 2002]. Wszystkie pomiary wykonano przy takich samych ustawieniach mikroskopu, przy powiększeniu obiektywu 20x.

6. Analiza statystyczna.

Z otrzymanych danych liczbowych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe dla każdej grupy pomiarów. Istotność statystyczną różnicy obliczonych średnich w stosunku do średnich uzyskanych z materiałów referencyjnych badano przy zastosowaniu testu U Manna-Whitney'a na poziomie istotności $p<0,05$.

Wyniki

WYNIKI

1. Wyniki wstępnych badań materiałów w tkance mięśniowej.

1.1. Kinetyka stanu zapalnego i napływu leukocytów.

Podczas analizy mikroskopowej preparatów zawierających skrawki tkankowe poddane testom histochemicznym obserwowano obok zmian nasilenia aktywności badanych enzymów także postępy procesu regeneracji tkanek i gojenia rany.

Proces regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych szkieletowych przebiegał szybciej w tych miejscach wszczepów, w których rozwijała się intensywnie ziarnina doprowadzająca tworzące się naczynia krwionośne włosowate. Ziarnina została utworzona z fibroblastów, komórek mezenchymatycznych i komórek nacieku zapalnego. Pobudzenie fibroblastów i komórek mezenchymatycznych do przekształcania się w ziarninę następowało dzięki sygnałom chemicznym wydzielanym przez komórki obronne, inicjujące stan zapalny. Mówiąc o korzystnym oddziaływaniu produkowanych przez leukocyty czynników inicjujących procesy regeneracyjne, nie należy zapominać, że zbyt długo trwający, nasilony stan zapalny może prowadzić do reakcji uczuleniowych i przyczynić się do dalszego uszkodzenia tkanek.

Seria 2-dniowa

W rozmazach wykonanych z miejsc wszczepów po 2 dniach od implantacji procentowy udział typów leukocytów różnił się w zależności od wszczepionego materiału. Liczba neutrofili była największa w przypadku wszczepów Sz2 i RMC, w materiale RM z kolei wysoki był napływ eozynofili. Duża liczebność neutrofili, a także eozynofili świadczy o ostrej fazie stanu zapalnego.

W materiale A2 udział procentowy neutrofili i eozynofili był najmniejszy – wywołany ostry stan zapalny miał mniejsze nasilenie, niż w przypadku pozostałych materiałów. Procentowy udział leukocytów w wymazach tkankowych przedstawiono na wykresie (Wyk.1).

Seria 7-dniowa

Ze względu na wszczep, będący ciałem obcym tkwiącym ciągle w tkance i stymulującym napływ komórek, faza ostra stanu zapalnego była przedłużona, wokół wszystkich materiałów obserwowano obfity naciek zapalny (Fig.3,7,17,31). Większe nasilenie stanu zapalnego obserwowano w okolicy materiałów A2 i RMC (Fig.17,31), którym

wciąż towarzyszył bardzo duży napływ neutrofili (będących istotnym elementem fazy ostrej stanu zapalnego), podczas gdy wokół materiału RM i Sz2 widoczne były już tylko niewielkie skupiska tych komórek.

W okolicy materiału Sz2 i A2 obserwowano z kolei nasilony proces fagocytozy – widoczne były liczne makrofagi wypełnione fagocytowanym materiałem.

Na terenie wszczepów obserwowano napływ komórek tucznych (mastocytów) i eozynofili. W materiałach Sz2 i A2 mastocytów było jeszcze stosunkowo niewiele, natomiast wysoka była liczba eozynofili. Materiały RM i RMC prowokowały napływ licznych komórek obu typów: mastocytów i eozynofili.

Kinetykę pojawiania się komórek tucznych i eozynofili pozwalającą wnioskować o przebiegu stanu zapalnego i procesów naprawczych w tkance przedstawiono na wykresie (Wyk 2).

Seria 30-dniowa

Definitywnie zakończyła się faza ostra stanu zapalnego: obecności neutrofili nie obserwowano już w żadnym ze wszczepów.

We wszczepach materiałów Sz2, A2 widoczne były makrofagi wypełnione ziarnistościami, obecność których świadczyła o przebiegającym dalej procesie usuwania drobnych odłamków biomateriału na drodze fagocytozy (Fig.21).

We wszystkich materiałach liczba mastocytów wzrastała (Fig.19) (świadczy to o wzmożonym procesie budowy tkanki ziarninowej, który przebiega w dużym stopniu pod wpływem czynników wydzielanych przez mastocyty), a eozynofili malała w stosunku do serii 7-dniowej (pierwszy wyrzut tych komórek spowodowany był głównie przez stan zapalny związany z zabiegiem chirurgicznym, a w mniejszym stopniu przez właściwości materiału) (Wyk.2).

Seria 90-dniowa

Nasilenie reakcji zapalnej tkanki na obecność wszczepu, przejawiające się wyrzutem leukocytów, stopniowo malało.

We wszczepach materiałów Sz2 i A2 widoczne były małe skupiska makrofagów (mniej niż w serii 30-dniowej) fagocytujących drobiny materiału.

W okolicy materiału Sz2 malała liczba i mastocytów, i eozynofili, w RM utrzymywała się na poziomie z serii 30-dniowej (Fig.27), w materiałach RMC i A2 liczba mastocytów wzrastała, a eozynofili malała (Wyk.2).

Seria 150-dniowa

W okolicy wszczepów materiałów Sz2, A2 wciąż były widoczne, choć coraz mniejsze, skupiska makrofagów ze sfagocytowanym materiałem.

Liczba mastocytów w niewielkim stopniu zmalała w przypadku materiałów A2, RM, RMC. Tylko w obecności materiału Sz2 – nieznacznie wzrosła. Liczba eozynofili zwiększyła się wokół materiałów S2 i RMC, natomiast zmalała wokół materiałów RM i A2 (Wyk.2).

Seria 180-dniowa

Nie obserwowano, poza pojedynczymi preparatami z materiałem Sz2, makrofagów ze sfagocytowanym materiałem.

We wszystkich materiałach, oprócz Sz2 odpowiedź zapalna stopniowo się wyciszyła: zdecydowanie spadła liczba mastocytów i eozynofili. We wszczepach materiału Sz2 liczba tych komórek wzrosła w porównaniu do poprzednich serii. Wzrosła również liczba eozynofili w materiale RMC, przy obniżonej liczbie mastocytów (Wyk. 2). Tkanka ziarninowa jest zastępowana regenerującą tkanką mięśniową i zajmuje coraz mniejszą powierzchnię wokół drobin biomateriałów, szczególnie w przypadku materiałów Sz2 i A2 (Fig.6,7,18,28; Wyk.7).

1.2. Regeneracja i aktywność enzymatyczna tkanek w miejscu wszczepu i w najbliższych okolicach.

Na terenie tkanki ziarninowej pojawiającej się w miejscu wszczepu wszystkich czterech biomateriałów intensywnie rozwijały się naczynia krwionośne, umożliwiając regenerację tkanek wokół implantów (Fig. 24,35,36).

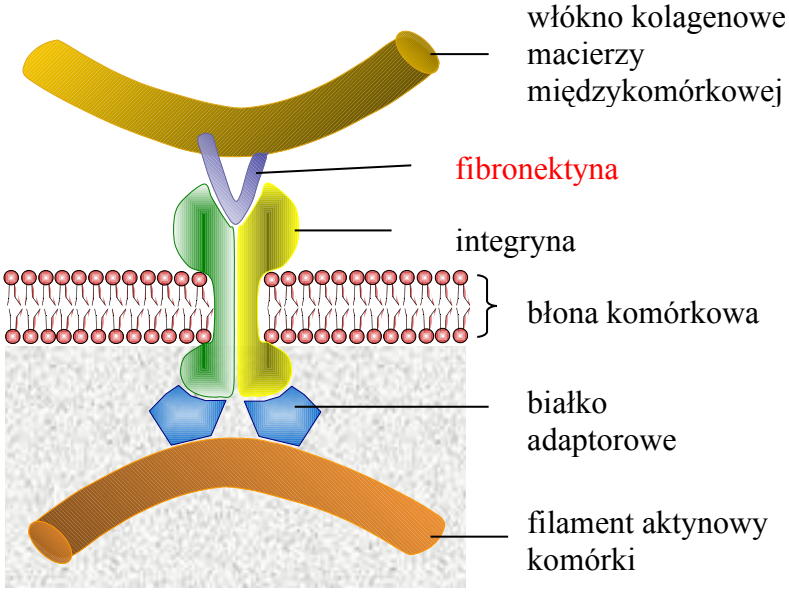
W włóknach mięśniowych wąskich i szerokich usytuowanych blisko wszczepów badanych biomateriałów obserwowano obniżenie aktywności enzymów utleniających G6PDH i NADHDH oraz szczególnie wyraźne obniżenie aktywności OCC tylko w początkowych seriach (7 i 30 dni) eksperymentu (Fig.13,23; Wyk.3,4,5). Porównywano aktywność enzymów utleniających włókien mięśniowych w bliskiej okolicy wszczepu z aktywnością tych enzymów w włóknach rozmieszczonych w większej odległości od wszczepu. Włókna mięśniowe dalszej okolicy w początkowych seriach eksperymentu cechowała wyższa aktywność OCC, NADHDH i G6PDH w porównaniu do włókien rozmieszczonych przy wszczepie. Aktywność enzymatyczna komórek mięśniowych usytuowanych w sąsiedztwie wszczepionych materiałów nie różniła się znacząco w zależności od rodzaju materiału. Regenerujące włókna mięśniowe, a więc bliskie miejsca wszczepu, pomimo mniejszych rozmiarów swoich przekrojów cechowały się podobną

aktywnością badanych enzymów utleniających do poziomu aktywności w pełni rozwiniętych, nieuszkodzonych włóknach mięśniowych (Fig.14,23). W serii 30-dniowej na terenie ziarniny otaczającej biomateriały obserwowano pojawienie się miotub, będących początkowym stadium tworzącego się włókna mięśniowego (Fig. 36). Szczególnie licznie pojawiające się regenerujące włókna mięśniowe obserwowano wokół materiałów Sz2 i A2 (Fig. 11,24,36). W trakcie trwania eksperymentu, w każdej następnej serii obserwowano zmniejszanie się ilości tkanki ziarninowej i/lub łącznej otaczających wszczepy, na korzyść regenerującej tkanki mięśniowej (Wyk.7).

Żaden z czterech badanych biomateriałów nie hamował możliwości regeneracji tkanki mięśniowej szkieletowej, jakkolwiek obecność ciała obcego zawsze spowalnia ten proces. W przypadku zwierząt kontrolnych, u których wykonano tylko nacięcie mięśnia, bez wprowadzenia implantu, po 90 dniach od zabiegu nie udało się odnaleźć miejsca, w którym nastąpiło uszkodzenie tkanki. proces regeneracji tkanki mięśniowej.

Materiały A2 i Sz2, które są materiałami resorbowalnymi i łatwo rozpadały się na drobne fragmenty (Fig.4,22), otaczane były białkami macierzy międzykomórkowej, w tym fibronektyny, która w normalnych warunkach uczestniczy w tworzeniu połączeń między komórkami i białkami włóknistymi substancji międzykomórkowej (Rys1). Właściwości powierzchni materiałów A2 i Sz2 sprzyjały przyłączaniu fibronektyny, a więc wstępnej „akceptacji" tych biomateriałów (Fig.15,16). Obecność fibronektyny umożliwiała następnie adherencję komórek: fibroblastów i leukocytów (Fig. 5,18).

Rys.1. Rola fibronektyny w połączeniu komórki z białkiem włóknistym substancji międzykomórkowej [wg Albertsa i wsp, 2005].



W przypadku wszczepów biomateriałów RM i RMC nie stwierdzono obecności fibronektyny na powierzchni tych materiałów. Wszczepione biomateriały RM i RMC występowały w postaci znacznie większych fragmentów niż biomateriały A2 i Sz2. Obserwowano tworzenie się gęstych sieci włókien łącznotkankowych wokół większych fragmentów materiałów RM i RMC i powstawanie jednolitej warstwy na ich powierzchni. Reakcje komórek ziarniny na obecność biomateriałów były zależne od wielkości fragmentów tych materiałów. Małe fragmenty biomateriałów były otaczane przez pojedyncze fibroblasty i komórki ziarniny, względnie przez olbrzymie komórki wielojądrowe typu około ciała obcego (Fig.4,5,20). Większe fragmenty biomateriałów, głównie RM i RMC, były otoczone wieloma warstwami fibroblastów i innych komórek ziarniny. W serii 180 dniowej w miejscu wszczepu materiału RMC obserwowano tworzenie się torebki łącznotkankowej włóknistej wokół dużych fragmentów biomateriału (Fig.32).

Komórki ziarniny wykazywały wzrastającą w kolejnych seriach aktywność G6PDH w miejscach wszczepów Sz2 i RM, wskazującą na wzmożone procesy produkcji nukleotydów i białek. Komórki wielojądrowe we wszczepach Sz2 cechowały się także podwyższeniem aktywności G6PDH (Fig.9,10). Aktywność NADHDH - enzymu transportu elektronów, a więc będąca równocześnie wskaźnikiem nasilenia aktywności wielu innych enzymów (a co za tym idzie, nasilenia metabolizmu) stopniowo obniżała się w komórkach ziarniny miejsc wszczepów A2, RM i RMC (Wyk.4). Obserwacja ta świadczy o obniżeniu tempa metabolizmu związanego z powolnym przekształcaniem się fibroblastów w fibrocyty oraz ze stopniowym wygaszaniem stanu zapalnego.

Aktywność OCC w komórkach ziarniny wokół wszczepów A2, Sz2 i RM (Fig.13,14,25,26,29; Wyk.3) utrzymywała się na niższym poziomie w porównaniu z aktywnością enzymów G6PDH (Fig.9,19; Wyk.5) i NADHDH (Fig.11,12; Wyk.4). Wszczepione materiały A2, Sz2 i RM prawdopodobnie wywołały w komórkach ziarniny wzrost tempa utleniania glukozy na szlaku pentozowym. Z kolei komórki ziarniny wokół wszczepu RMC wykazywały przeciętnie wyższą aktywność OCC (Wyk.3), szczególnie w porównaniu z aktywnością dehydrogenaz NADH i G6P (Fig.33; Wyk.4,5), które w przypadku tego materiału były stosunkowo niskie.

W komórkach tkanki ziarninowej pojawiającej się wokół wszczepów obserwowano wysokie nasilenie aktywności fosfatazy kwaśnej (Wyk.6), będącej enzymem hydrolitycznym zawartym w lizosomach. Szczególnie wysoką aktywnością FK charakteryzują się komórki nacieku zapalnego, uczestniczące w fagocytozie obcych substancji obecnych na terenie macierzy międzykomórkowej. Wysoka aktywność FK w najbliższym sąsiedztwie granul

biomateriałów świadczy o przewadze liczebności komórek zapalnych w stosunku do fibroblastów i fibrocytów. W przypadku materiałów Sz2 i A2 obserwowano wysokie nasilenie reakcji wykrywającej aktywność FK we wszystkich seriach czasowych eksperymentu. Wokół materiału RM aktywność FK obniżyła się w serii 180-dniowej (Fig.30), natomiast wokół RMC mniejsze zagęszczenie komórek z wysoką aktywnością FK obserwowano w serii 90-dniowej (Fig34), a wyraźny spadek aktywności już w serii 150-dniowej, ze względu na stopniowe zastępowanie tkanki ziarninowej tkanką łączną włóknistą.

Najbardziej efektywnie proces regeneracji przebiegał w obecności wszczepu bioszkła Sz2. W miejscach wszczepu tego materiału obserwowano najwyższą aktywność enzymów uczestniczących w procesie przebudowy tkanek: dehydrogenazy G6P i hydrolazy FK. Najszybciej też dokonywał się proces zastępowania tkanki ziarninowej tkanką mięśniową. Powierzchnia tkanki ziarninowej wokół bioszkła Sz2 w serii 180-dniowej w porównaniu do serii 30-dniowej była mniejsza niż w przypadku pozostałych materiałów (Fig.6, Wyk.7), co pozwala wnioskować o szybszym tempie zastępowania tkanki ziarninowej tkanką mięśniową.

Podsumowanie

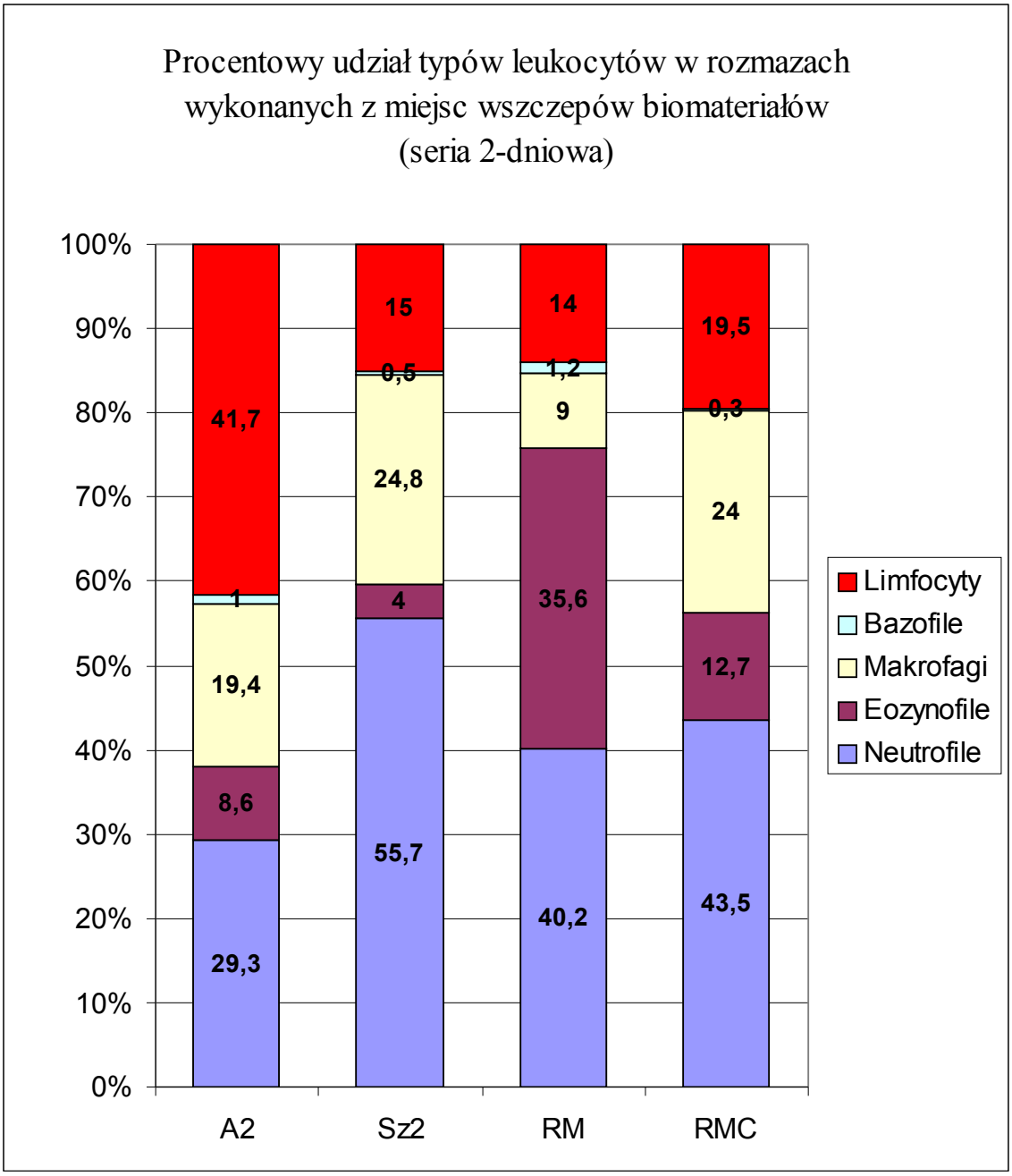
Proces regeneracji tkanek przebiegający przy współudziale mastocytów i eozynofili oraz makrofagów był podobny wokół wszczepów z materiałami A2, RM i RMC, przy czym największą mobilizację tych komórek obserwowano przy materiale A2. Wokół materiału Sz2 po obniżeniu liczebności napływających mastocytów i eozynofili już w 90 dniu, nastąpił nawrót zwiększonej liczebności tych komórek w serii 180-dniowej, związany prawdopodobnie z przebudową tkanki ziarnistej.

Materiały Sz2 i A2 w obecności płynów tkankowych łatwo ulegały rozpadowi na drobne fragmenty, które następnie były fagocytowane, a w obszarach, w których zostały zresorbowane, obserwowano całkowitą lub zaawansowaną regenerację tkanek. Materiały RM i RMC występujące w postaci dużych ziaren zostawały najczęściej odizolowane torebką łącznotkankową. Na charakter przebiegu regeneracji w dużym stopniu miała więc wpływ wielkość fragmentów biomateriałów.

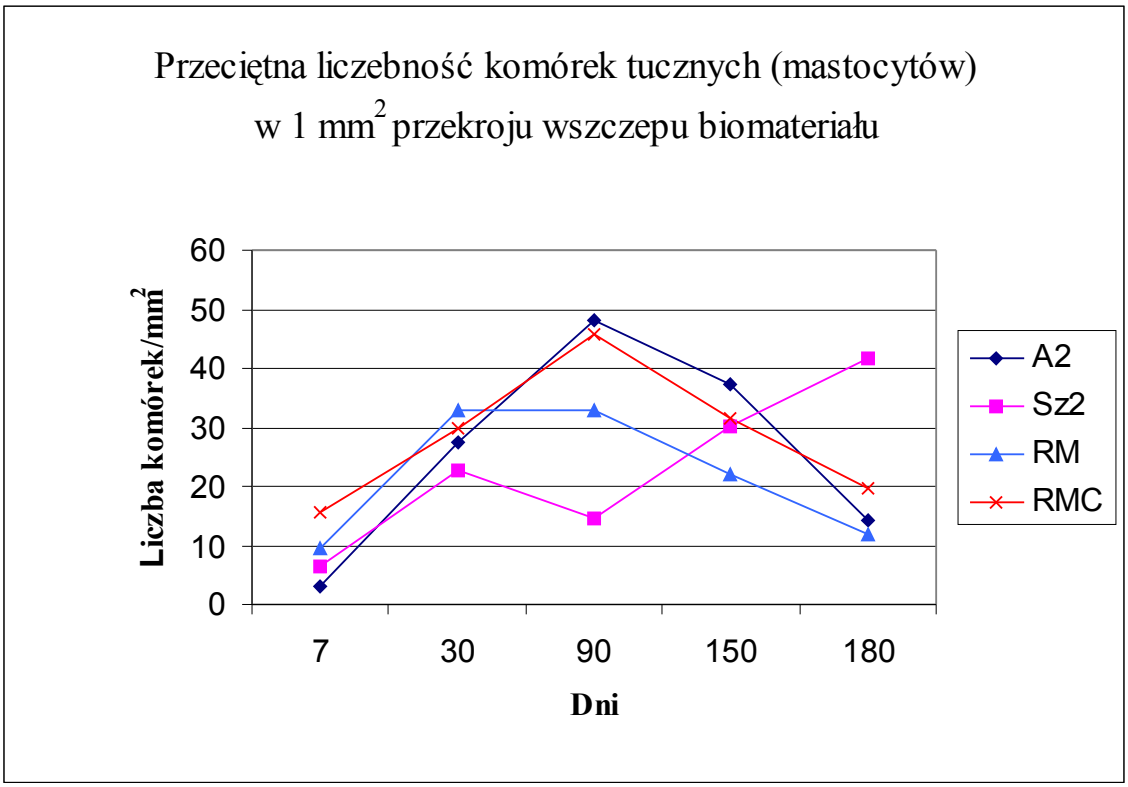
Obecność biomateriałów w tkankach, poza serią 7 i 30-dniową, nie wywołała wyraźnego obniżenia aktywności enzymów utleniających tj. G6PDH, NADHDH i OCC w sąsiadujących ze wszczepem komórkach mięśni.

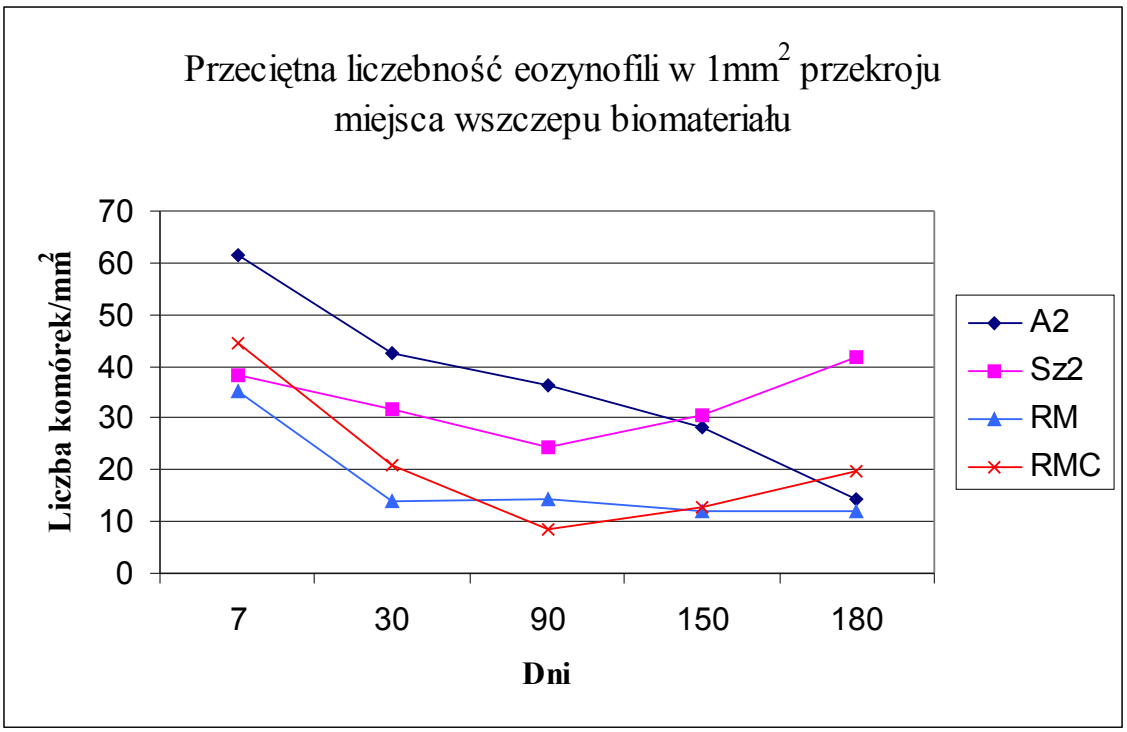
Stwierdzono postępujący proces regeneracji tkanki mięśniowej w obecności badanych biomateriałów.

Wykres 1. Procentowy udział poszczególnych typów leukocytów w wysięku zapalnym wokół wszczepionych do tkanki mięśniowej biomateriałów A2, Sz2, RM i RMC po 2 dniach od implantacji.

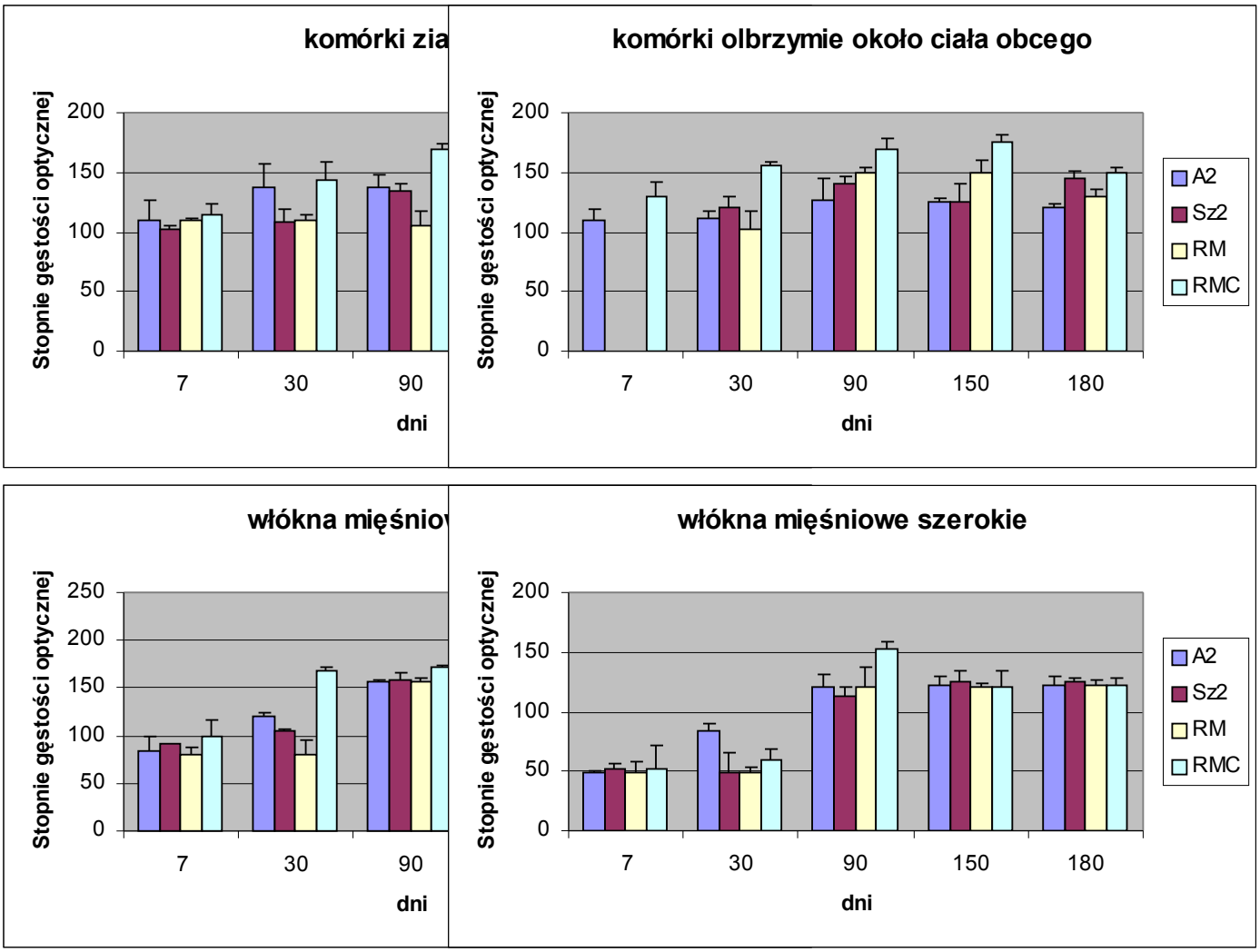


Wykres 2. Przeciętna liczebność leukocytów a) mastocytów i b) eozynofili w 1mm^2 przekroju miejsca wszczepu biomateriałów A2, Sz2, RM, RMC w kolejnych seriach eksperymentu.

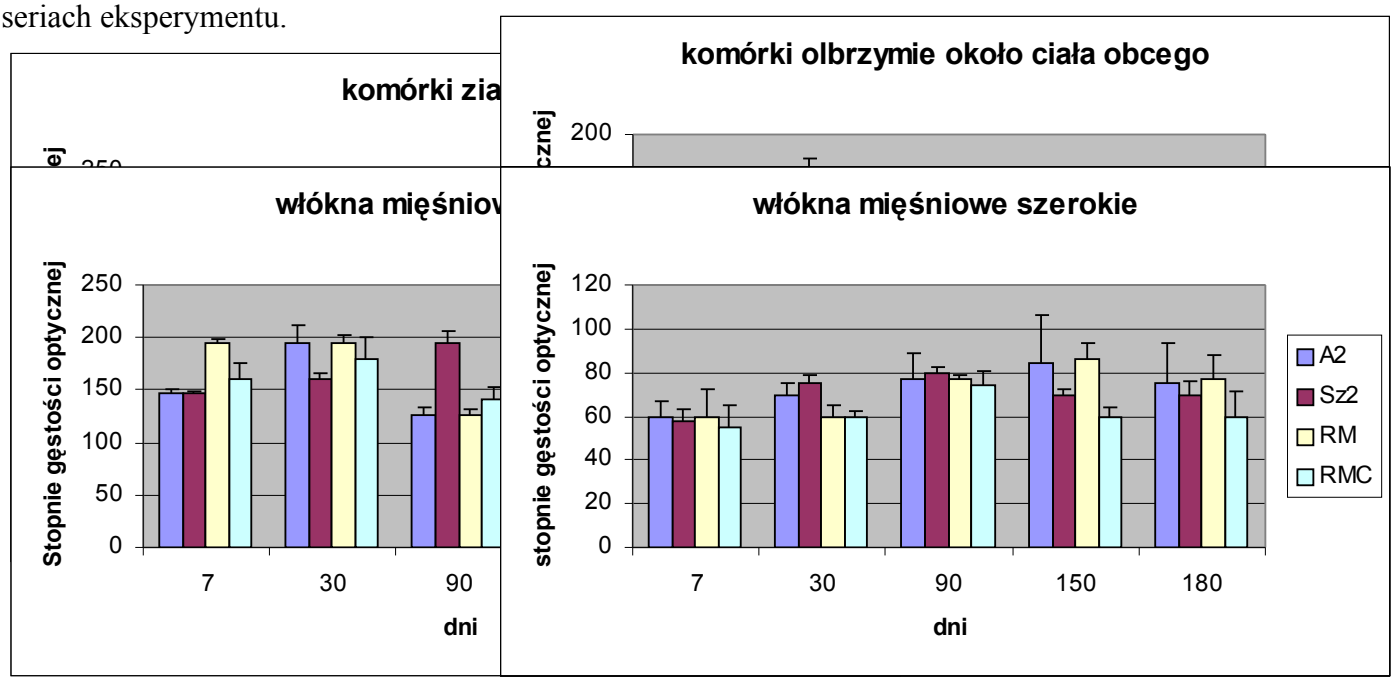




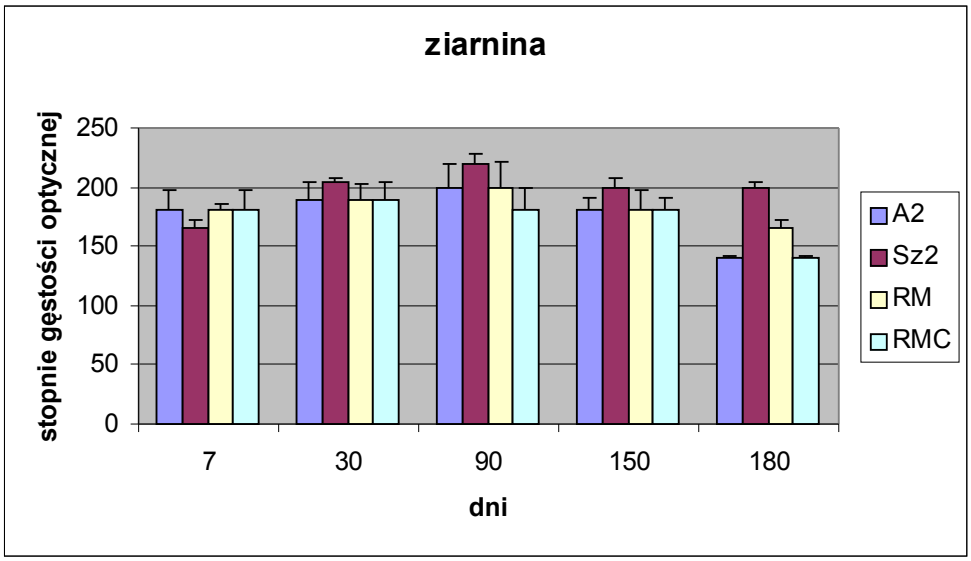
Wykres 3. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność oksydazy cytochromu c (OCC) w komórkach tkanek otaczających wszczepy biomateriałów A2, Sz2, RM i RMC w kolejnych seriach eksperymentu.

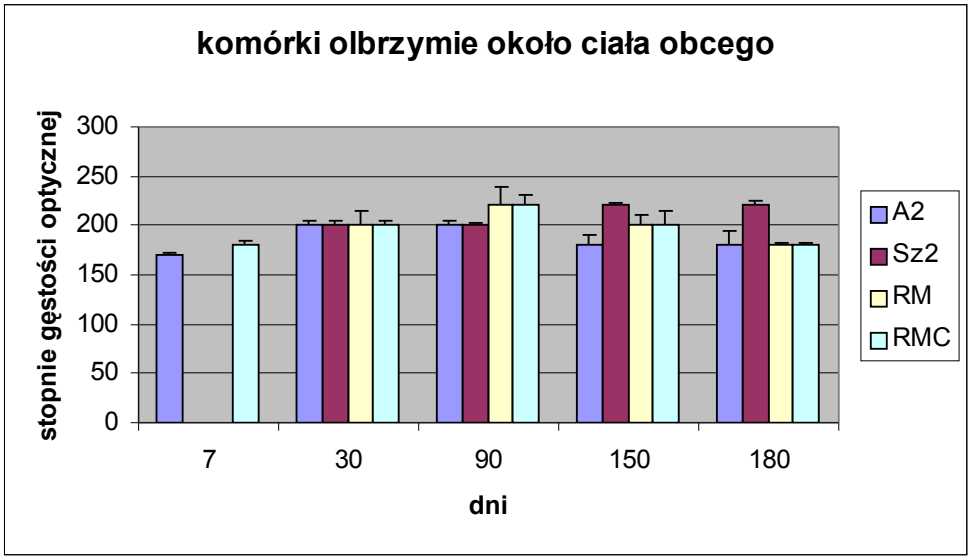


Wykres 4. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność dehydrogenazy NADH (NADHDH) w komórkach tkanek otaczających wszczepy biomateriałów A2, Sz2, RM i RMC w kolejnych seriach eksperymentu.

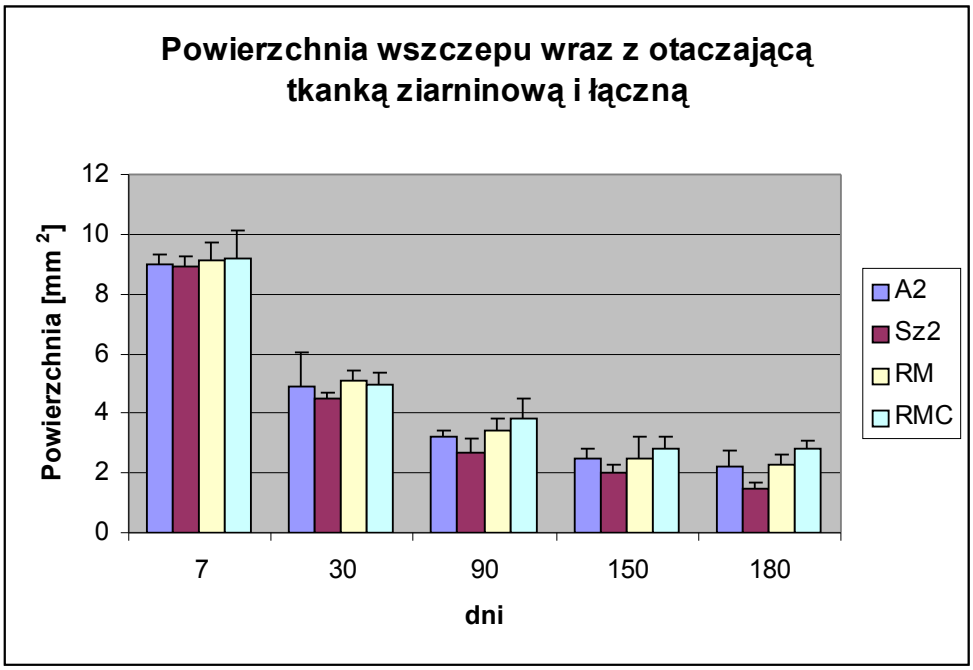


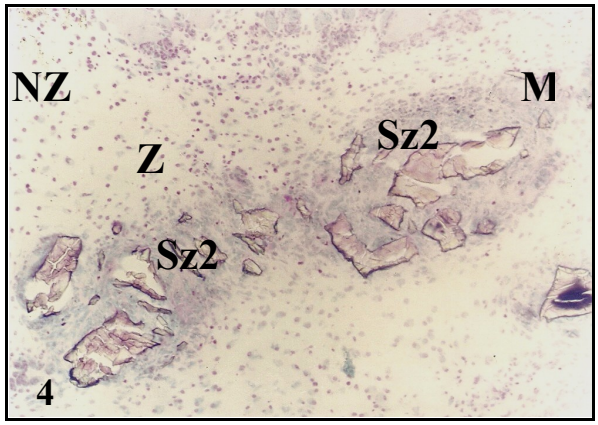
Wykres 6. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność fosfatazy kwaśnej FK w komórkach tkanek otaczających wszczepy biomateriałów A2, Sz2, RM i RMC w kolejnych seriach eksperymentu.

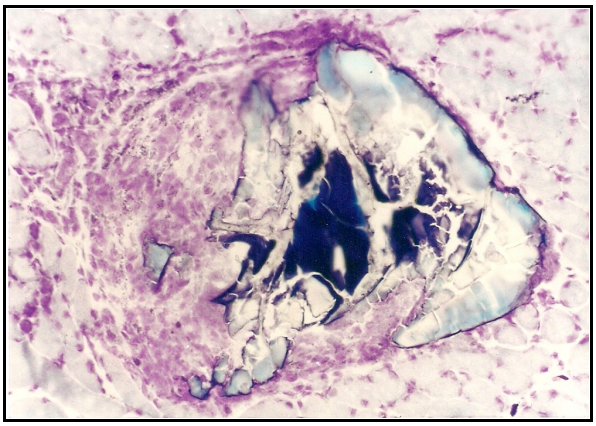




Wykres 7. Powierzchnia, jaką zajmują wszczepy materiałów A2, Sz2, RM i RMC wraz z otaczającą je tkanką ziarninową i łączną w kolejnych seriach eksperymentu.



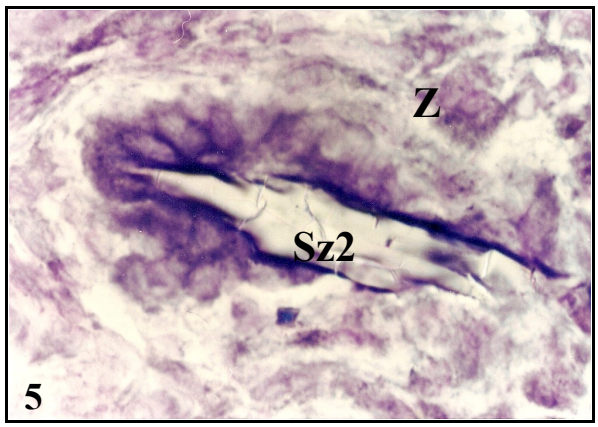


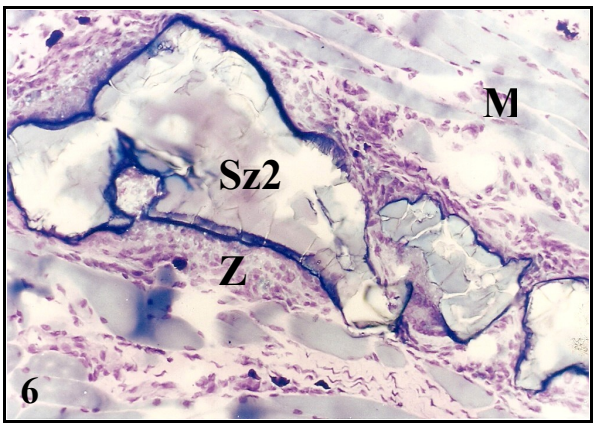


3

Fig.3.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Obfity naciek zapalny w miejscu implantacji. Granule materiału Sz2 otoczone komórkami formującej się tkanki ziarninowej. Seria 7-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 10x.

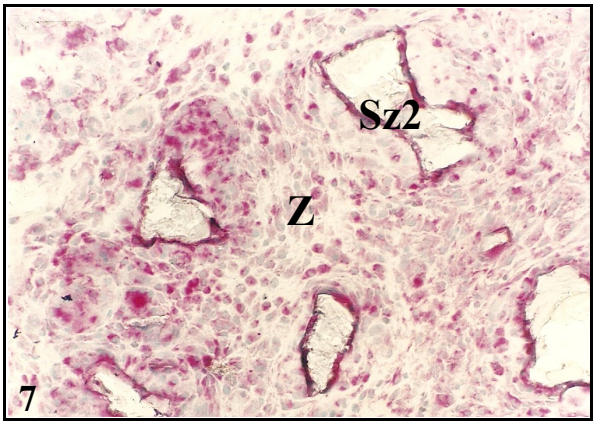
Fig.4.
Rozpadający się fragment wszczepu biomateriału Sz2. Granule materiału Sz2 otoczone komórkami ziarniny. Fragment implantu przylega bezpośrednio do tkanki mięśniowej. Seria 30-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.





Fot.5.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Pojedynczy odłamek materiału Sz2 otoczony ciasno przylegającymi komórkami. Seria 90-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 40x.

Fot.6.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Granule bioszkła otoczone niewielką ilością ziarniny wpasowane między wrastające pasma tkanki mięśniowej, zastępującej stopniowo tkankę ziarninową. Seria 180-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.



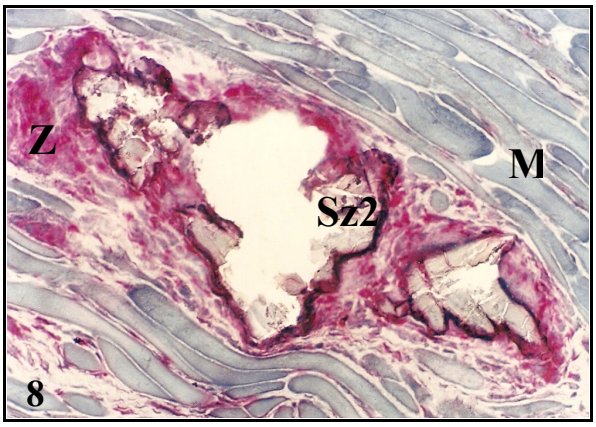
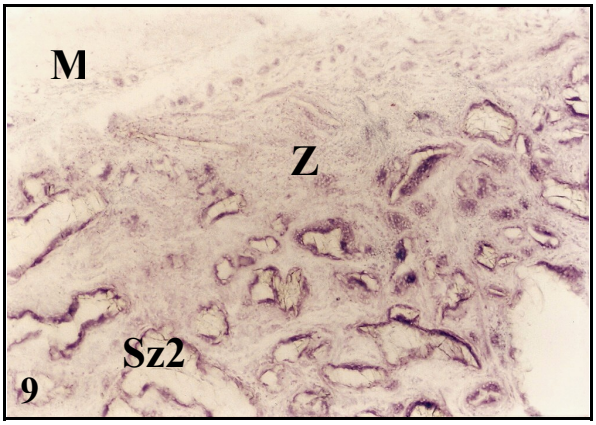


Fig.7.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Obfity naciek zapalny w miejscu implantacji. Granule materiału Sz2 otoczone komórkami formującej się tkanki ziarninowej, wśród których widoczne są monocyty/makrofagi wykazujące intensywne zabarwienie cytoplazmy. Seria 7-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 20x.

Fig.8.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Bioszkło otoczone zredukowaną ilością ziarniny o wysokiej aktywności FK, otoczone nową tkanką mięśniową. Widoczne drobne – regenerujące włókna mięśniowe. Seria 180-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 20x.



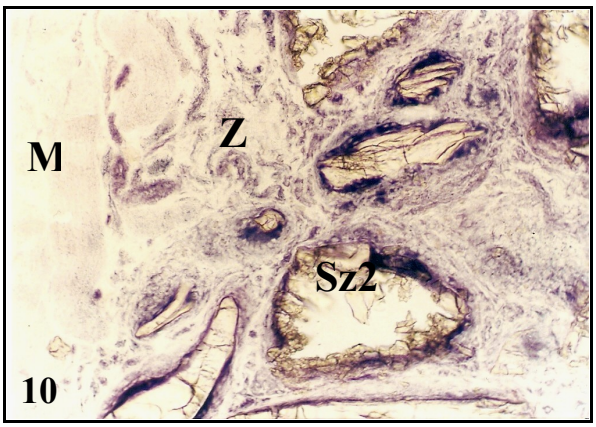
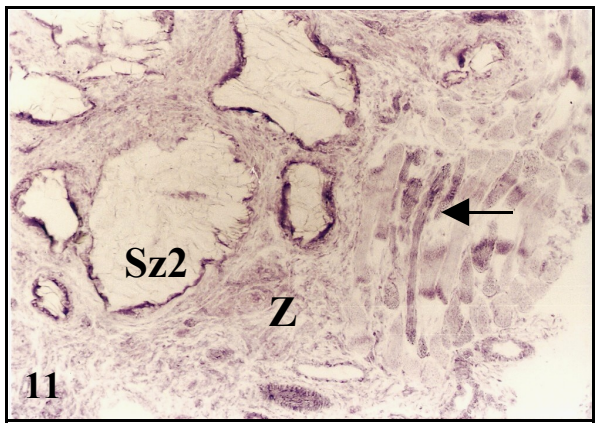


Fig.9.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Bioszkło otoczone tkanką ziarninową wykazującą aktywność G6PDH, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu G6PDH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.10.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Bioszkło otoczone tkanką ziarninową wykazującą aktywność G6PDHDH, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Seria 90-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu G6PDH. Powiększenie obiektywu 20x.



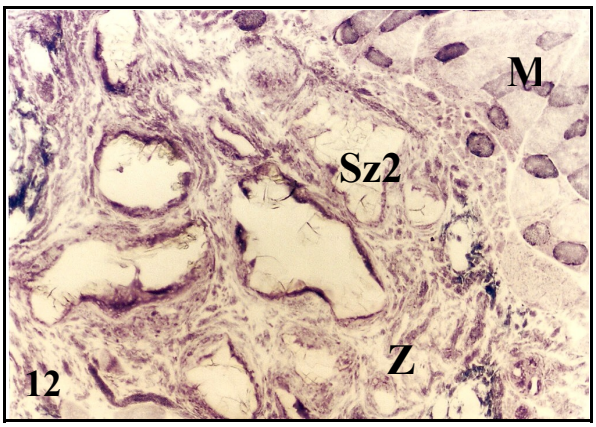
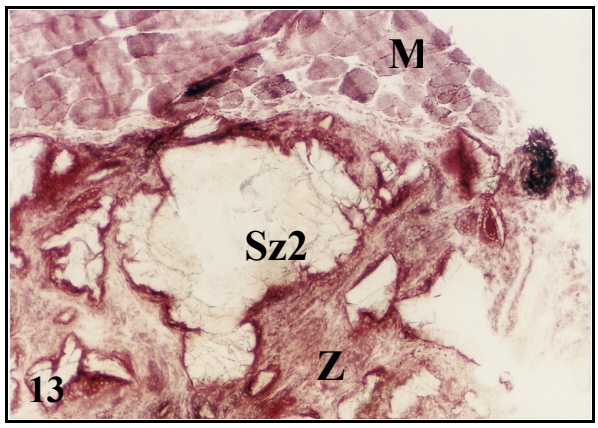


Fig.11.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Bioszkło otoczone tkanką ziarninową wykazującą aktywność dehydrogenazy NADH, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Strzałką zaznaczone włókna mięśniowe regenerujące. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.12.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Bioszkło otoczone tkanką ziarninową wykazującą aktywność dehydrogenazy NADH, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Przylegająca tkanka mięśniowa wykazuje prawidłowy mozaikowy układ włókien. Obecne liczne drobne włókna regenerujące. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 10x.



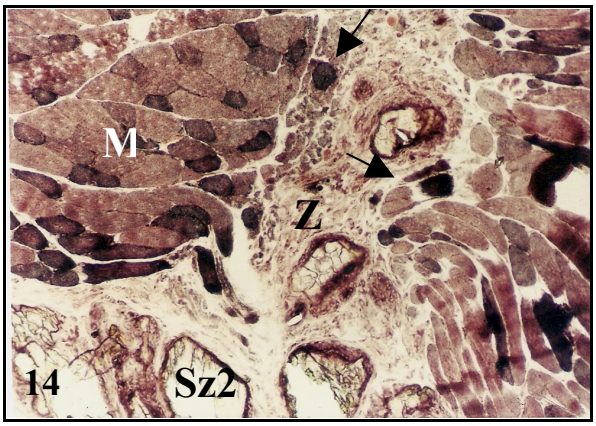
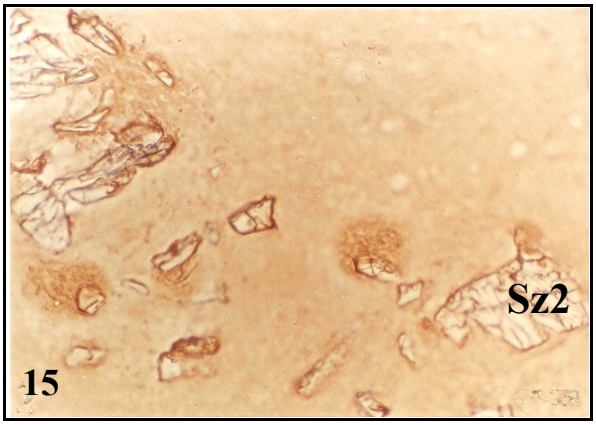


Fig.13.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Tkanka ziarninowa wykazuje aktywność OCC, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Aktywność enzymu w sąsiadującej tkance mięśniowej nieco niższa. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.14.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału Sz2. Nasilenie reakcji wykazującej aktywność OCC wysokie w komórkach przylegających do bioszkła i przylegającej tkance mięśniowej Widoczne liczne włókna mięśniowe regenerujące. Seria 90-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.



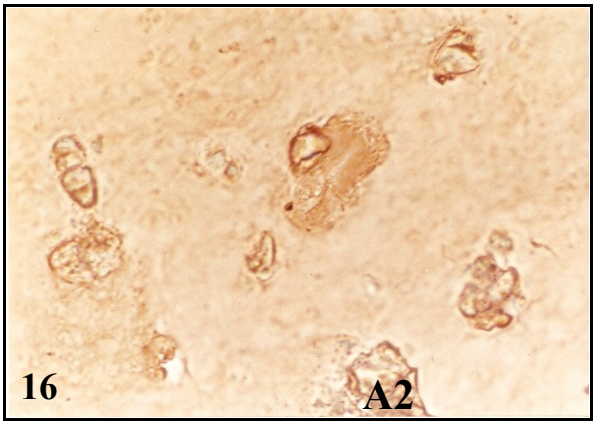
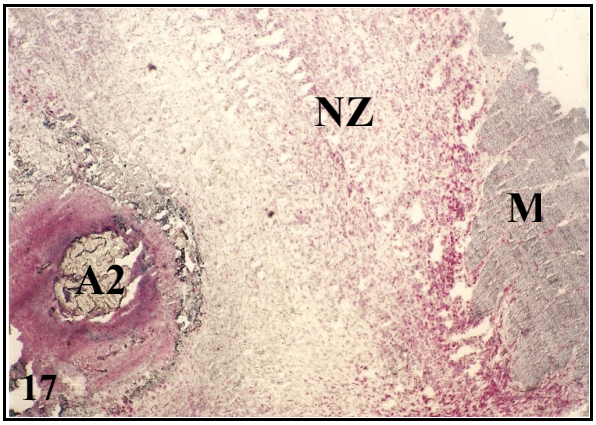


Fig.15.
Fragment przekroju tkanki mięśniowej szczura w miejscu wszczepu biomateriału Sz2. Seria 7-dniowa. Obecność fibronektyny dookoła małych fragmentów biomateriału Sz2, barwienie metodą immunohistochemiczną. Powiększenie obiektywu 20x.

Fig.16.
Fragment przekroju tkanki mięśniowej szczura w miejscu wszczepu biomateriału A2. Seria 7-dniowa. Obecność fibronektyny dookoła małych fragmentów biomateriału A2, barwienie metodą immunohistochemiczną. Powiększenie obiektywu 20x.



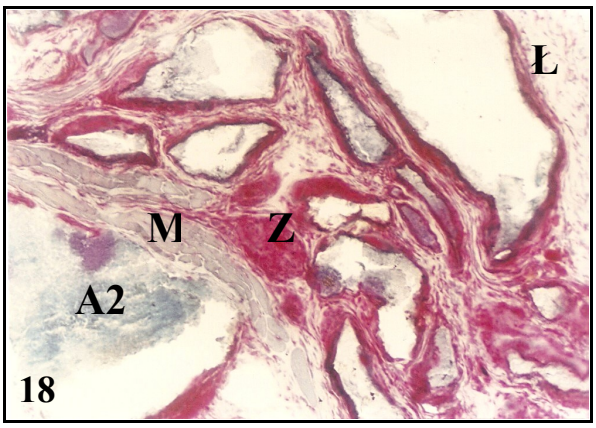
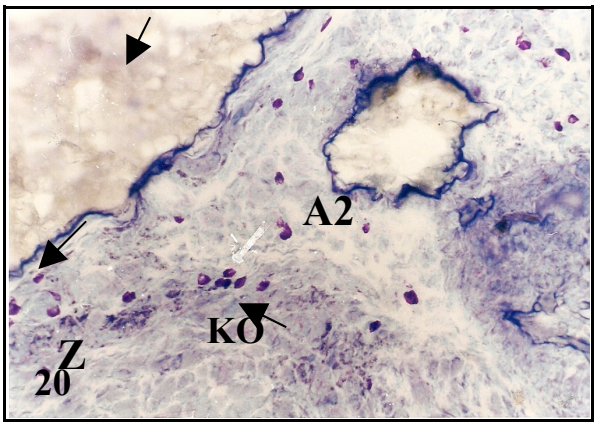


Fig.17.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Rozległy naciek zapalny wokół wszczepu. Silna aktywność FK zwłaszcza w najbliższym sąsiedztwie materiału. Seria 7-dniowa. Barwienie histochemiczne wykrywające aktywność FK. Powiększenie obiektywu 4x.

Fig.18.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Niewielka ilość ziarniny tylko przy samym materiale. Silna aktywność FK widoczna w komórkach przylegających do materiału A2. Widoczne ziarna bioszkła przylegające bezpośrednio do tkanki mięśniowej. Seria 180-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność FK. Powiększenie obiektywu 10x.

A2



19

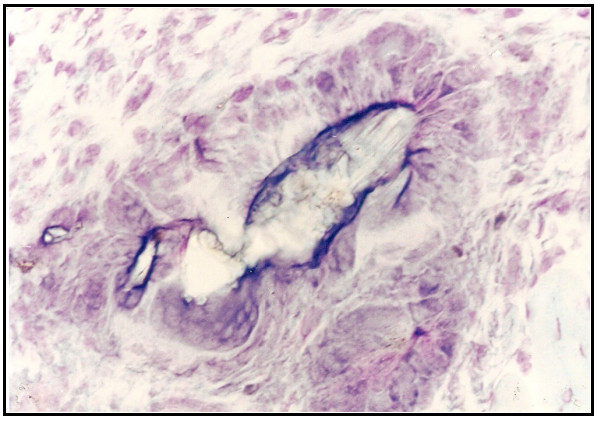
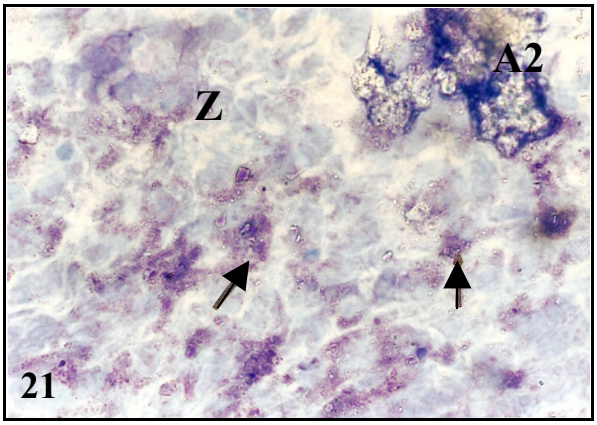


Fig.19.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Granule materiału A2 otoczone licznymi komórkami nacieku zapalnego i fibroblastami. Zwraca uwagę napływ dużej liczby mastocytów (strzałki). Seria 30-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.

Fig.20.
Fragment wszczepu biomateriału A2. Ziarna bioszkła A2 otoczone przylegającymi ciasno komórkami tkanki ziarninowej. Widoczne również formujące się komórki wielojądrowe. W pobliżu obecne eozynofile i degranulujące mastocyty. Seria 30-dniowa. Barwienie Pappenheima. Powiększenie obiektywu 100x.



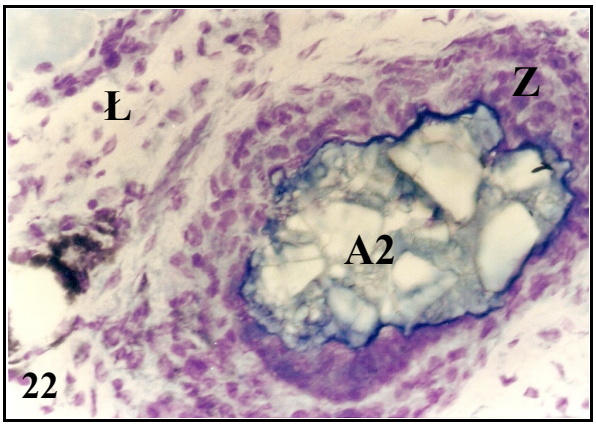
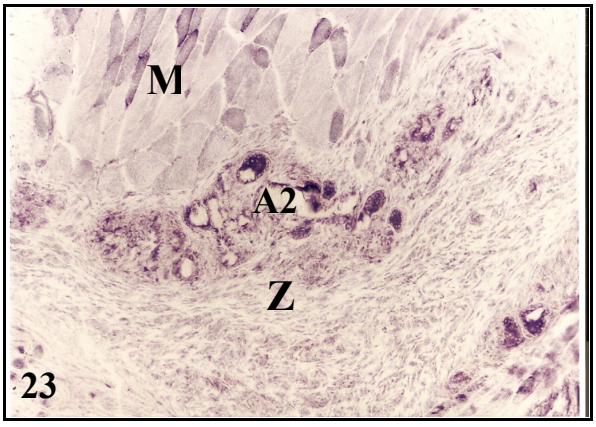


Fig.21.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Zwraca uwagę bardzo intensywna resorpcja i fagocytoza drobin materiału (strzałki). Seria 90-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 100x.

Fig.22.
Fragment biomateriału A2 otoczony komórkami ziarniny. Zewnętrzna warstwa ziarniny zastępowana jest stopniowo przez tkankę łączną włóknistą. Seria 90-dniowa. Barwienie Pappenheima. Powiększenie obiektywu 40x.



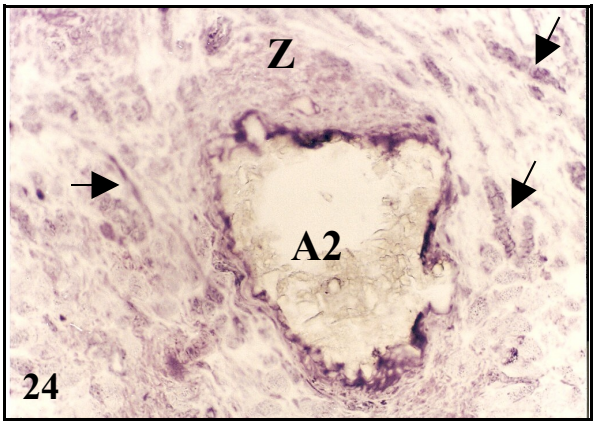
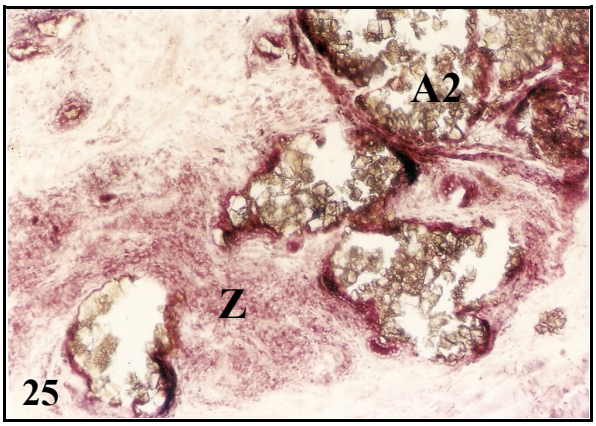


Fig.23.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Bioszkło otoczone tkanką ziarninową wykazującą aktywność dehydrogenazy NADH, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Aktywność enzymu w tkance mięśniowej przylegającej do wszczepu nieco obniżona. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.24.
Ziarno bioszkła A2 otoczone tkanką ziarninową wykazującą umiarkowaną aktywność dehydrogenazy NADH. Na terenie ziarniny widoczne tworzące się kapilary (strzałki). Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 20x.



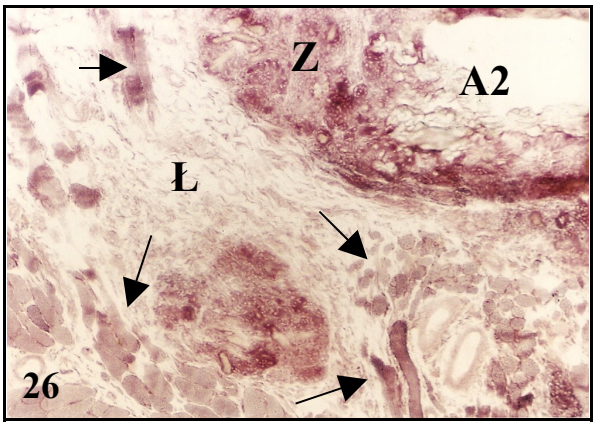
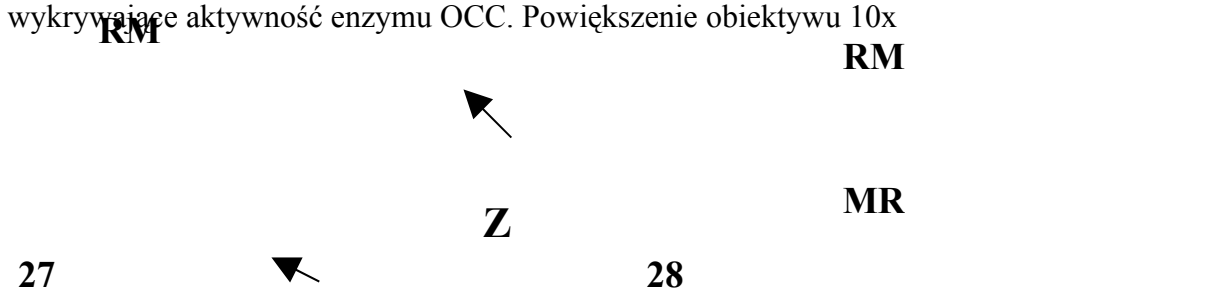
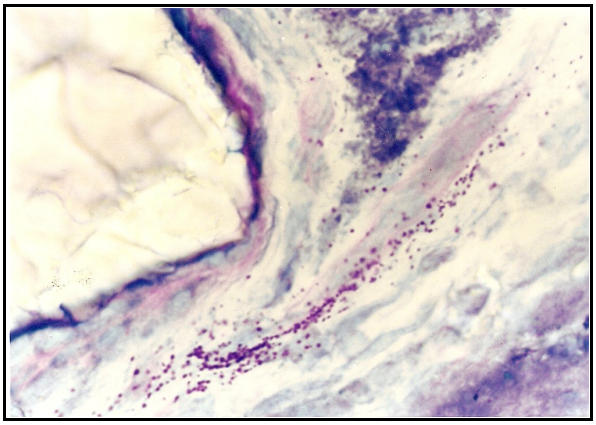


Fig.25.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Tkanka ziarninowa wykazuje aktywność OCC, szczególnie wysoką w komórkach przylegających do bioszkła. Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.26.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału A2. Tkanka ziarninowa otaczająca biomateriał wykazuje wysoką aktywność OCC. Widoczne liczne włókna mięśniowe regenerujące migrujące na teren tkanki łącznej wokół wszczepu (strzałki). Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x





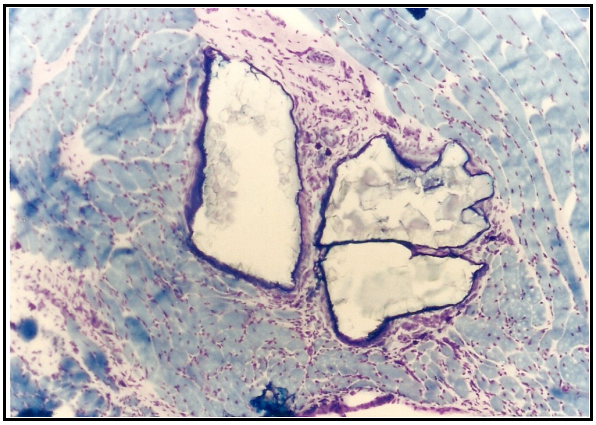
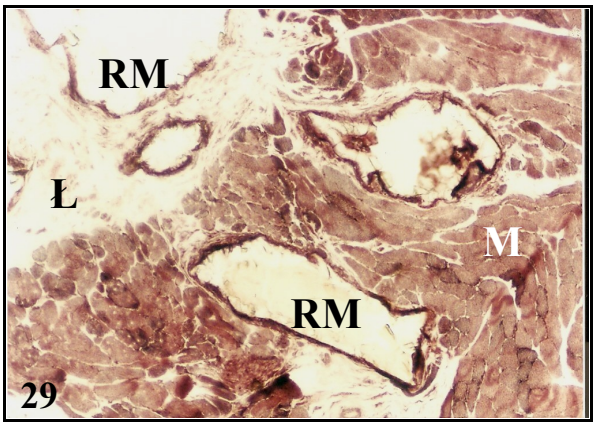


Fig.27.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RM. Bioszkło otoczone komórkami tkanki ziarninowej i włóknami kolagenu. Zwraca uwagę degranulacja mastocytów (strzałki). Seria 90-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 100x.

Fig.28.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RM. Bioszkło otoczone niewielką ilością tkanki ziarninowej i włóknami kolagenu. W bliskim sąsiedztwie granul biomateriału pojawiły sie liczne drobne włókna mięśniowe. Seria 180-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 10x.



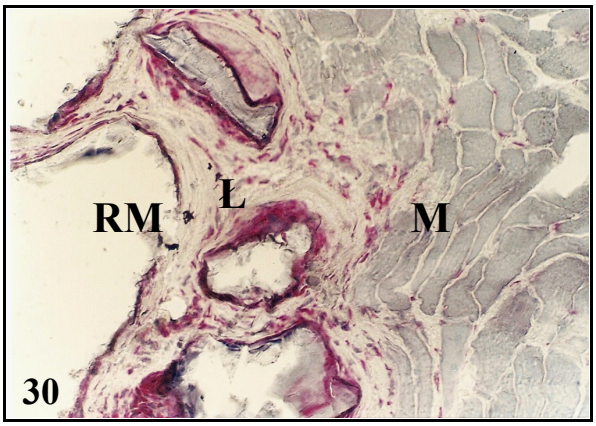
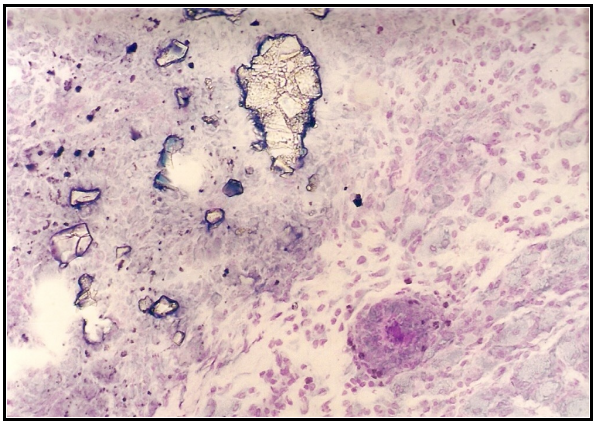


Fig.29.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RM. Mniejsze ziarna bioszkła częściowo otoczone przez tkankę mięśniową, większe - przez tkankę łączną włóknistą. Widoczne drobne włókna mięśniowe. Seria 90-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.30.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RM. Bioszkło otoczone 1-2 warstwami aktywnych komórek ziarninowych i tkanką łączną włóknistą. Seria 180-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 10x.

RMC
Z
M
RMC
Z
Ł



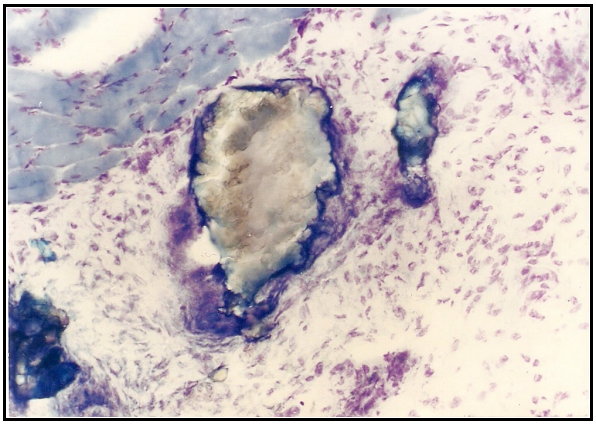
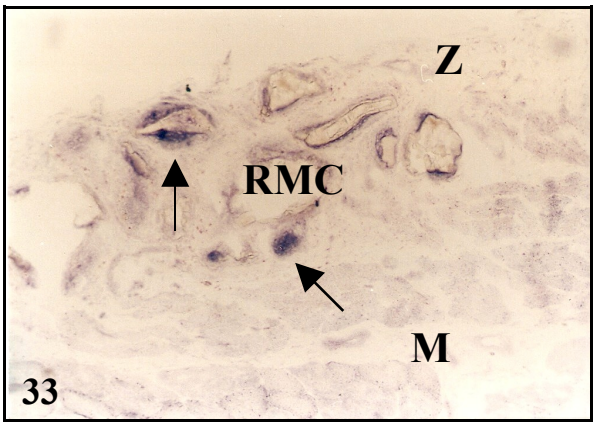


Fig.31.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RMC. Granule materiału otoczone licznymi komórkami nacieku zapalnego i fibroblastami. Zwraca uwagę napływ dużej liczby mastocytów. Seria 7-dniowa. Barwienie metodą Pappenheima. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.32.
Fragment wszczepu biomateriału RMC. Granule materiału otoczone dużą ilością tkanki łącznej włóknistej. Seria 90-dniowa. Barwienie Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.



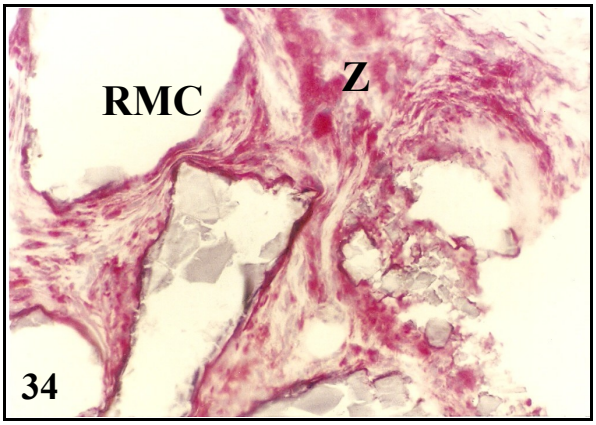


Fig.33.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RMC. Granule materiału otoczone tkanką ziarninową o niskiej aktywności G6PDH i umiarkowanej w komórkach przylegających do szkła (strzałki). Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność enzymu G6PDH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.34.
Fragment miejsca wszczepu biomateriału RMC. Granule materiału otoczone tkanką ziarninową o umiarkowanej aktywności FK. Seria 90-dniowa. Barwienie histochemiczne wykrywające aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 20x.

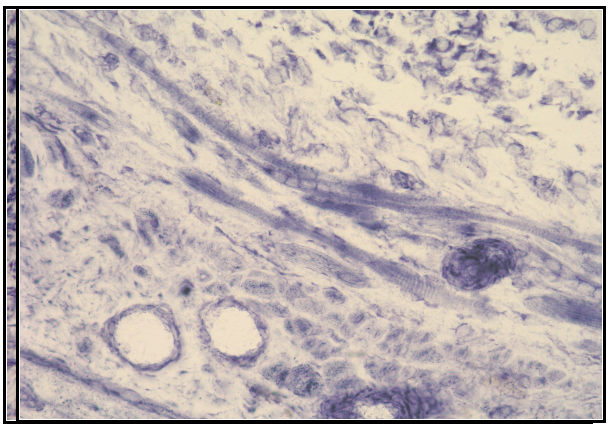


Fig.35.
Przekrój przez tkankę ziarninową w okolicy wszczepu biomateriału Sz2. Widoczne liczne formujące się naczynia włosowate (strzałki). Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.36.
Przekrój przez tkankę ziarninową w okolicy wszczepu biomateriału Sz2. Widoczne miotuby, będące wczesną fazą regenerującego włókna mięśniowego (strzałka), formujące się naczynie włosowate (krótka strzałka) i przekroje poprzeczne przez naczynia krwionośne (NK). Seria 30-dniowa. Barwienie wykrywające aktywność dehydrogenazy NADH. Powiększenie obiektywu 20x.

2. Wyniki badań materiałów w tkance kostnej.

2.1. Kinetyka stanu zapalnego i obserwacje morfologiczne.

Seria 3-dniowa

Tkanki serii 3-dniowej w przypadku obu materiałów (Sz2 i v-SiO_2) wyglądały podobnie. W tak krótkim czasie od operacji nie ujawnił się jeszcze specyficzny wpływ właściwości danego materiału na procesy gojenia, występował stan zapalny charakteryzujący się dużym napływem leukocytów, głównie neutrofili. Widoczne było słabe związanie wszczepionego materiału z tkanką. Wszczep Sz2 otoczony był przez włóknik, z którym częściowo związane są granule wszczepionego materiału. Nie obserwowano natomiast umocowania ziaren żadnego z wszczepionych materiałów w tkance ziarninowej.

Seria 7-dniowa

W serii 7-dniowej zaczęły uwidaczniać się różnice pomiędzy dwoma zastosowanymi materiałami. W przypadku materiału Sz2 następowała zabudowa tkankowa wszczepu i związanie granul biomateriału przez białka substancji międzykomórkowej i komórki powstającej ziarniny (Fig.41). Zaznaczyły się też różnice w wyglądzie samych wszczepionych materiałów: granule Sz2 już w serii 7-dniowej ulegały fragmentacji, pojawiły się pęknięcia wypełniane przez komórki, natomiast materiał SiO_2 występował w postaci słabo związanych z tkanką ziaren (Fig.41,38).

W niektórych wycinkach tkankowych z zastosowanym materiałem Sz2 pojawiła się tkanka chrzęstna lub kostnina z zainicjowanym procesem tworzenia się beleczek kostnych (Fig.37).

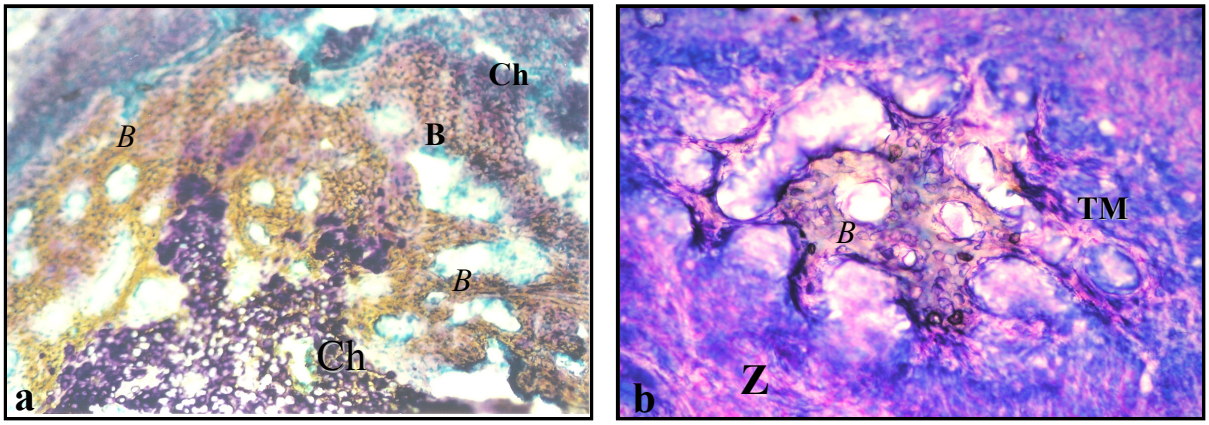
Seria 21-dniowa

Różnice pomiędzy dwoma wszczepionymi materiałami stały się bardzo wyraźne. Podczas gdy luźno związane granule SiO_2 łatwo ulegały wypłukaniu podczas procedur histologicznych i histochemicznych (Fig.46,50), wokół materiału Sz2 powstała zwarta tkanka ziarninowa, na powierzchni oraz w tworzących się w ziarnach materiału szczelinach występowały komórki o wysokiej aktywności enzymatycznej (Fig.45,54). Na terenie ziarniny odnotowano obecność nielicznych komórek wielojądrowych typu około ciała obcego, natomiast licznie występowały eozynofile i zdegranulowane (czyli aktywne) mastocyty.

We wszystkich przypadkach z Sz2 i w 3 z 8 przypadków z wszczepionym v-SiO_2 stwierdzono powstawanie nowej tkanki kostnej. W większości wycinków tkankowych z Sz2

obserwowano ośrodki kostnienia również w obrębie wszczepu, zarówno na bazie tkanki chrzęstnej, jak i tkanki mezenchymatycznej (Fig.69).

Fig.69. Kostnienie na bazie a) tkanki chrzęstnej; b) tkanki mezenchymatycznej.



Beleczki kostne, które powstawały albo w powiązaniu z pozostałym po zabiegu fragmentem kości zbitej, albo poza nim, narastały wokół ziaren bioszkła. Zwraca uwagę biomimetyzm szkła Sz2: ziarna uległy wtopieniu w strukturę beleczek (Fig39,40,42) i podobnie jak beleczki kostne były pokryte komórkami. W okolicach i na powierzchni granul bioszkła Sz2 licznie występowały komórki o wysokiej aktywności FA i morfologii osteoblastów (Fig. 57). Liczba komórek wykazujących aktywność FA była zdecydowanie niższa w przypadku materiału v-SiO_2 (Fig.58).

Seria 42-dniowa

Różnice pomiędzy dwoma wszczepionymi materiałami były wciąż widoczne. Na terenie ziarniny obserwowano występowanie nielicznych komórek wielojądrowych typu około ciała obcego. We wszystkich wycinkach tkankowych z Sz2 i w 4 przypadkach z 8 z materiałem v-SiO_2 obserwowano ośrodki kostnienia. Beleczki kostne, które powstawały albo w powiązaniu z pozostałym po zabiegu fragmentem kości zbitej, albo poza nim, narastały wokół ziaren bioszkła. Zwraca uwagę mimetyzm bioszkła Sz2: ziarna uległy wtopieniu w strukturę beleczek (Fig.61) i podobnie jak beleczki były pokryte komórkami o wysokiej aktywności enzymatycznej. Obserwowano też przebudowę nowo utworzonej tkanki kostnej beleczkowej w tkankę kostną zbitą, w którą wbudowane były niezresorbowane jeszcze granule bioszkła (Fig. 47).

Seria 90-dniowa

Ze względu na postępujący rozwój tkanki kostnej i jej mineralizacji, w tej serii utrudnione było pozyskanie cienkich skrawków do badań histochemicznych z nieutrwalonej i nieodwapnionej tkanki. W preparatach histologicznych barwionych metodą Massona-Goldnera można było zaobserwować pozostałości bioszkieł na terenie nowopowstałej tkanki kostnej zbitej (Fig.43). Fragmenty bioszkieł służyły tu za rusztowanie nie tylko osteoblastom, ale i komórkom mezenchymatycznym w jamkach szpikowych (Fig.43,44). Mimo zaawansowanego stanu przebudowy kostnej obserwowano wciąż występowanie dużej ilości tkanki ziarninowej otaczającej część wszczepionego materiału (Fig.43).

2.2. Aktywność enzymatyczna tkanek w miejscu wszczepu i w najbliższych okolicach.

Seria 3-dniowa

We wszystkich badanych skrawkach tkankowych obraz był podobny, charakterystyczny dla wczesnej fazy stanu zapalnego. Obserwowano obfity wysięk zapalny i obecność pasm włóknika. Leukocyty naciekające miejsca wszczepów obu materiałów wykazywały wysoką aktywność enzymów FA i FK. Aktywność enzymów OCC, NADHDH i G6PDH w powstającej dopiero tkance ziarninowej była stosunkowo niska (Wyk.8,9,10). Nie obserwowano pozytywnego wyniku w reakcji z alizaryną, ani w reakcji wykrywającej aktywność TRAP, stąd na wykresach przedstawiających wyniki tych reakcji seria 3-dniowa została pominięta. Podobnie nie przedstawiono wartości dla tej serii na wykresie nasilenia aktywności FA. W serii 3-dniowej aktywność FA na terenie wszczepu wykazywały wyłącznie leukocyty, dopiero w późniejszych seriach reakcja była odzwierciedleniem przede wszystkim aktywności osteoblastów.

Seria 7-dniowa

W serii 7-dniowej obserwowano wyższe nasilenie reakcji wykrywających aktywność wszystkich badanych enzymów dla materiału Sz2. Widoczne były liczne aktywne osteoblasty związane z powierzchnią wszczepu i występujące w jego bezpośrednim sąsiedztwie. Oprócz głównych enzymów utleniających, nastąpiło istotne podwyższenie intensywności reakcji wykrywającej aktywność G6PDH, która jest wskaźnikiem procesów regeneracyjnych w tkance (Wyk.10).

Statystycznie istotne różnice między obydwoma zastosowanymi materiałami widoczne były dla pomiarów aktywności enzymów hydrolitycznych (Wyk.11, 12).
Statystycznie istotne różnice między Sz2 a v-SiO_2 na korzyść bioszkła widoczne były również w produkcji kolagenu (Wyk.14).

Seria 21-dniowa

W serii 21-dniowej nadal obserwuje się statystycznie istotne wyższe nasilenie reakcji enzymatycznych w przypadku materiału Sz2 niż v-SiO_2 (Fig.49-58; Wyk.8-12). Jednocześnie w tej serii nasilenie aktywności większości badanych enzymów było istotnie wyższe niż w pozostałych – krótszych i dłuższych seriach eksperymentalnych (Wyk.8-12).
Widoczne były liczne aktywne osteoblasty związane z powierzchnią granul wszczepu Sz2 i występujące w jego bezpośrednim sąsiedztwie (Fig.57,58), identyfikowane za pomocą reakcji wykrywającej aktywność FA. Różnica w aktywności tego enzymu między oboma materiałami jest wysoce istotna statystycznie (Wyk.11).
Istotne statystycznie są również różnice w aktywności enzymów hydrolitycznych. W okolicach i na powierzchni granul bioszkła Sz2 licznie występowały komórki o wysokiej aktywności FA (Fig. 57), a także komórki wykazujące wysoką aktywność FK, TRAP i EN (Fig.53,67). Liczba komórek wykazujących aktywność FA, FK, TRAP i EN była zdecydowanie niższa w przypadku materiału v-SiO_2 (Fig. 56,58,68).
W tkankach wokół wszczepów Sz2 obserwowano również wysoką aktywność komórek przejawiającą się produkcją kolagenu. W reakcji van Giesona wykazano wysoką zawartość kolagenu w preparatach z Sz2 i znacznie niższą w tkankach z wszczepionym v-SiO_2 (Fig.63,64; Wyk.14). Podobny wynik uzyskano w reakcji alizarynowej: wyższą zawartość jonów wapniowych stwierdzono w tkankach z Sz2 niż v-SiO_2 (Wyk.13).
W serii 21-dniowej na terenie kostniny obserwowano występowanie nielicznych komórek wielojądrowych, natomiast licznie występowały eozynofile i mastocyty. Mastocyty występowały zazwyczaj w formie zdegranulowanej, co świadczy o ich wysokiej aktywności.

Seria 42-dniowa

W okolicach i na powierzchni granul bioszkła Sz2 licznie występowały komórki o wysokiej aktywności FA i morfologii osteoblastów (Fig.61,62), a także komórki wykazujące wysoką aktywność FK. Liczba komórek wykazujących aktywność FA była zdecydowanie niższa w przypadku materiału SiO_2 (Wyk.11). Nasilenie aktywności wszystkich badanych enzymów było wyższe w tkankach otaczających implanty Sz2

w porównaniu do implantów v-SiO_2 (Wykres8-12). Stwierdzono wysoką aktywność dehydrogenazy G6P w miejscach wszczepu bioszkła Sz2, co świadczy o ciągle intensywnie przebiegających procesach regeneracji tkanki w obecności bioszkła (Wyk.10). Aktywność oksydazy cytochromu c świadcząca o sprawności metabolicznej komórek była szczególnie wysoka w przypadku wszczepów materiału Sz2 (Fig.47,48; Wyk.8). Komórki o wysokiej aktywności występowały zarówno na powierzchni wszczepu, jak i w skupiskach w bliskim sąsiedztwie. Miejsca o niskiej aktywności OCC odpowiadały występowaniu włókien kolagenowych rozdzielających pasmami tkankę ziarninową wokół drobin wszczepu (Fig.47).
Produkcja kolagenu wciąż była wyższa wokół materiału Sz2 niż v-SiO_2, zwiększyła się też ilość kolagenu w porównaniu do serii 21-dniowej (Wyk.14).
Niższa natomiast, niż w serii 21-dniowej, choć wciąż wyższa w porównaniu do v-SiO_2, była zawartość jonów wapnia w tkankach wokół Sz2 (Fig.65,66; Wyk.13).

Gorszy wynik dla serii 42-dniowej w porównaniu do 21-dniowej może być spowodowany zmniejszeniem się ilości tkanki ziarninowej wokół wszczepu na rzecz beleczek kostnych przebudowywanych następnie w tkankę kostną zbitą.

Seria 90-dniowa

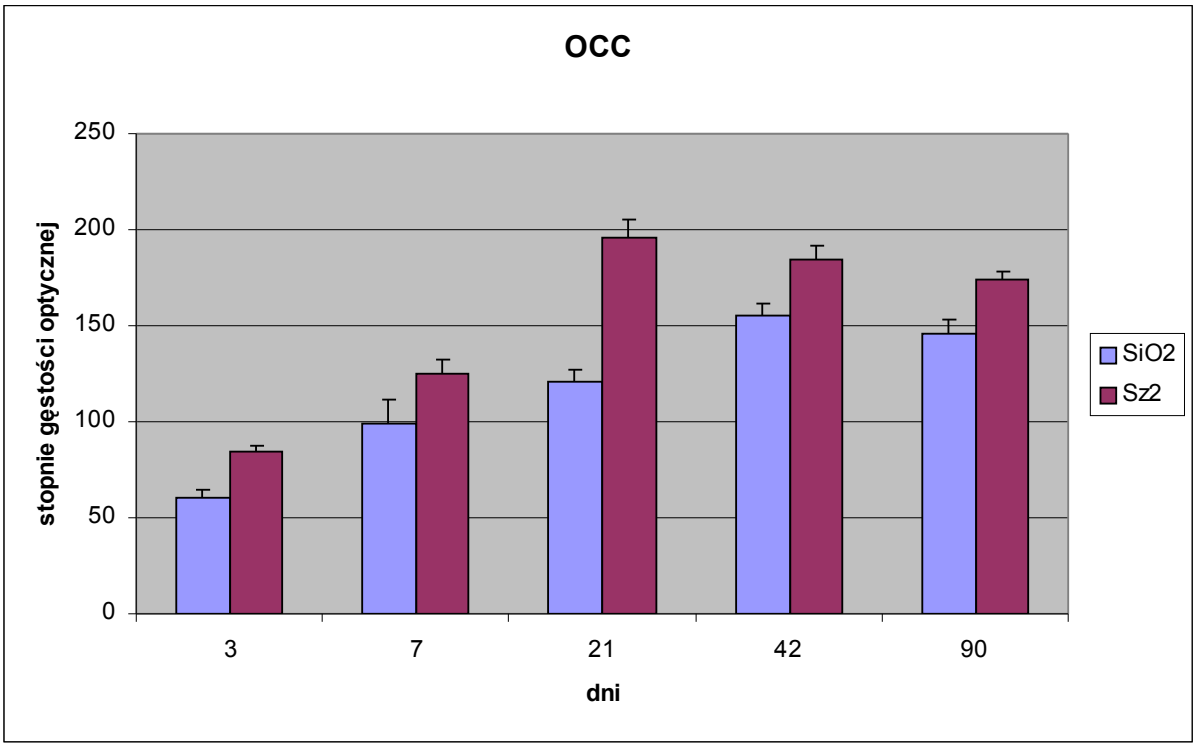
W serii 90-dniowej zmniejszyła się ilość ziarniny na korzyść nowo tworzonej tkanki kostnej. W tkance kostnej zbitej aktywność enzymów była niższa w stosunku do tkanki ziarninowej otaczającej główną masę wszczepu. Tkanka ziarninowa wciąż wykazywała wysokie nasilenie aktywności wszystkich badanych enzymów, w tym fosfatazy kwaśnej i dehydrogenazy G6P (Wyk.8-12), szczególnie w przypadku bioszkła Sz2. W tej serii stwierdzono też wysoką zawartość kolagenu w tkankach (Wyk.14). Ponieważ znaczna część masy wszczepionego bioszkła uległa już resorpcji, obserwowano spadek nasilenia reakcji alizarynowej, wykrywającej obecność depozytów wapniowych (Wyk.13).

Podsumowanie

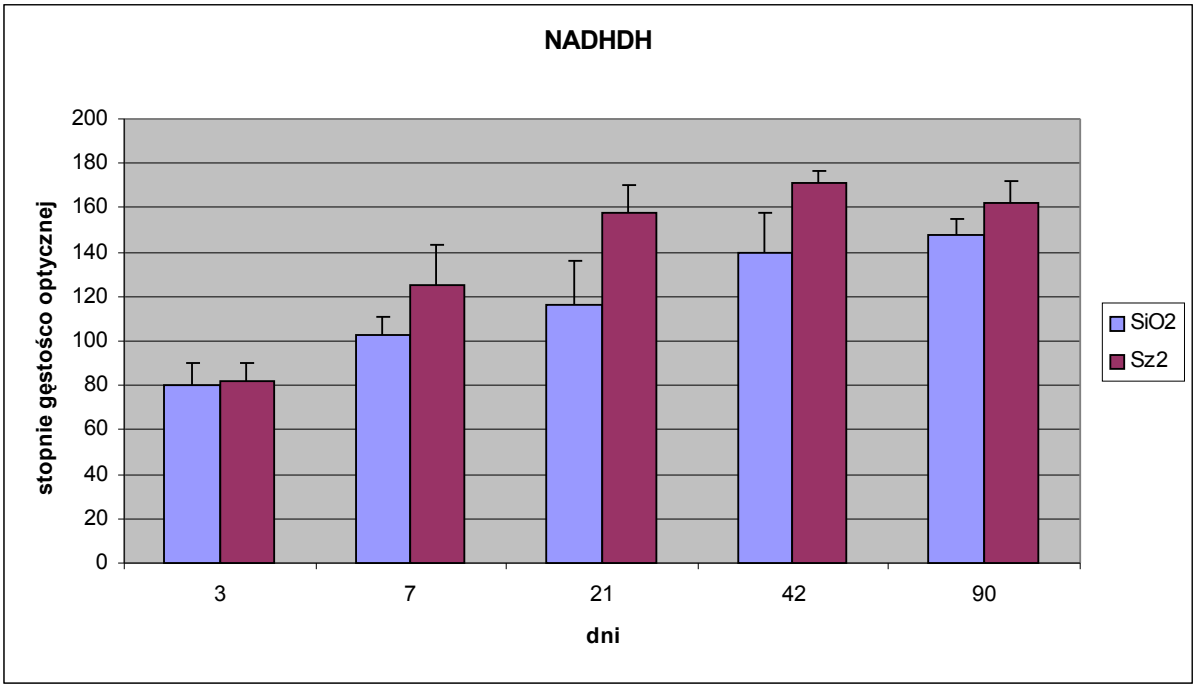
Wyraźne różnice pomiędzy dwoma zastosowanymi materiałami zaznaczyły się w serii 7-dniowej i utrzymały się w pozostałych seriach, aż do końca eksperymentu. W przypadku materiału Sz2 lepsza była zabudowa tkankowa miejsca wszczepu i związanie go z komórkami. Widoczne były różnice w wyglądzie samych wszczepów: materiał Sz2 już w serii 7-dniowej ulegał fragmentacji, pojawiły się pęknięcia wypełniane przez komórki, natomiast materiał v-SiO_2 występował w postaci słabo związanych z tkanką kryształów.

Tkanki w miejscach wszczepu bioszkła Sz2 we wszystkich seriach wykazywały większą aktywność enzymatyczną w porównaniu do obojętnego szkła krzemionkowego v-SiO_2. W obecności bioszkła Sz2 szybciej też dochodziło do wytworzenia nowej tkanki kostnej w miejscu ubytku.

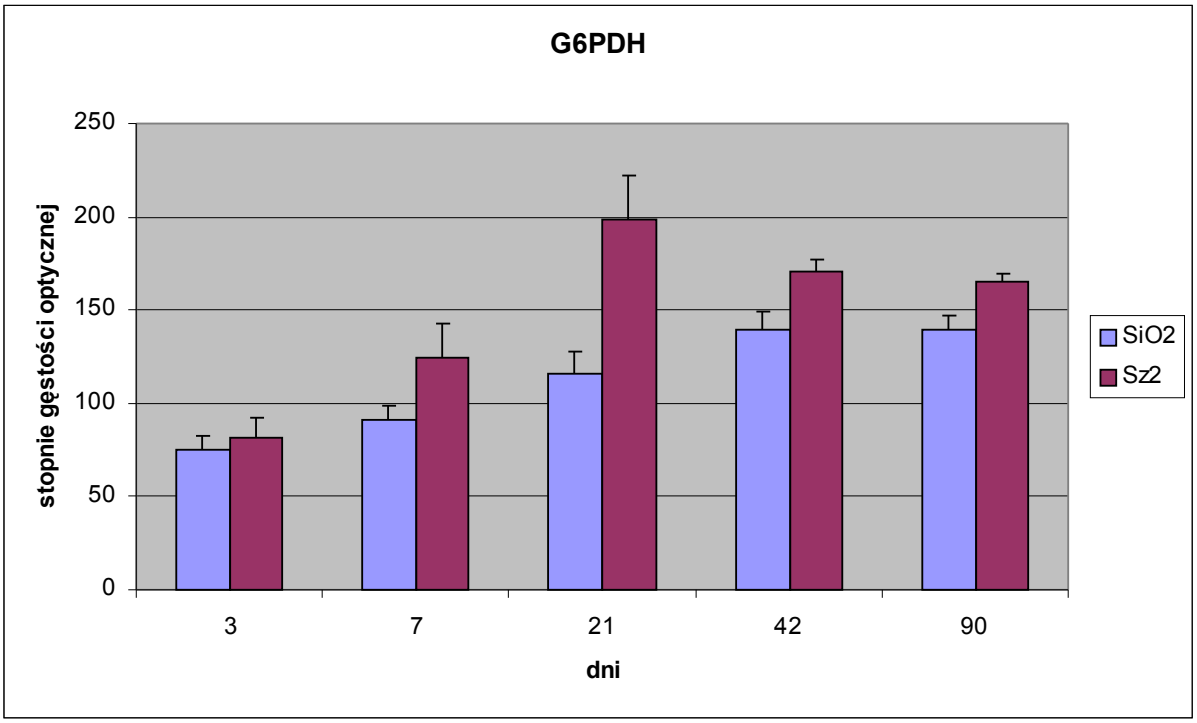
Wykres 8. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność oksydazy cytochromu c w tkance ziarninowej wokół wszczepów szkieł Sz2 i SiO_2.



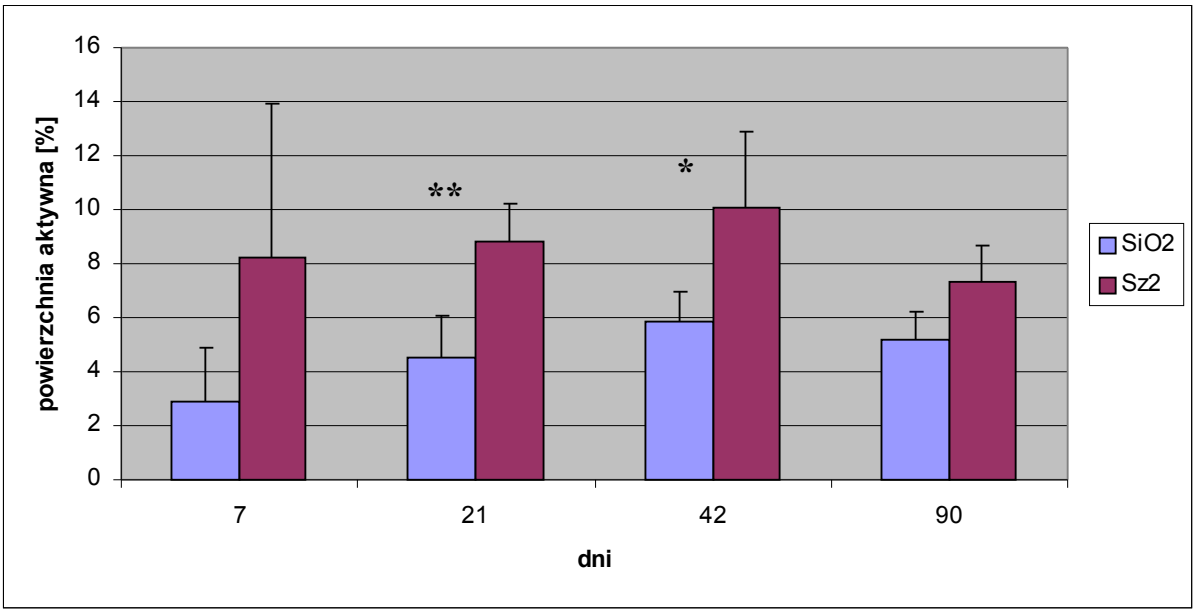
Wykres 9. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność dehydrogenazy NADH w tkance ziarninowej wokół wszczepów szkieł Sz2 i SiO_2.



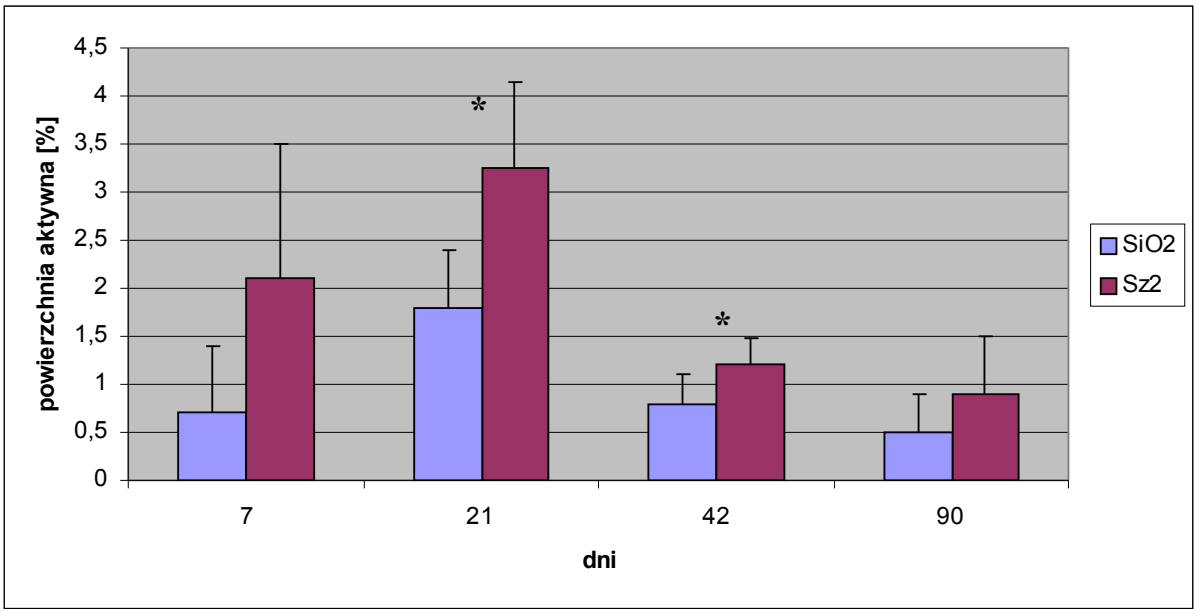
Wykres 10. Nasilenie reakcji wykrywającej aktywność dehydrogenazy G6P w tkance ziarninowej wokół wszczepów szkieł Sz2 i SiO_2.



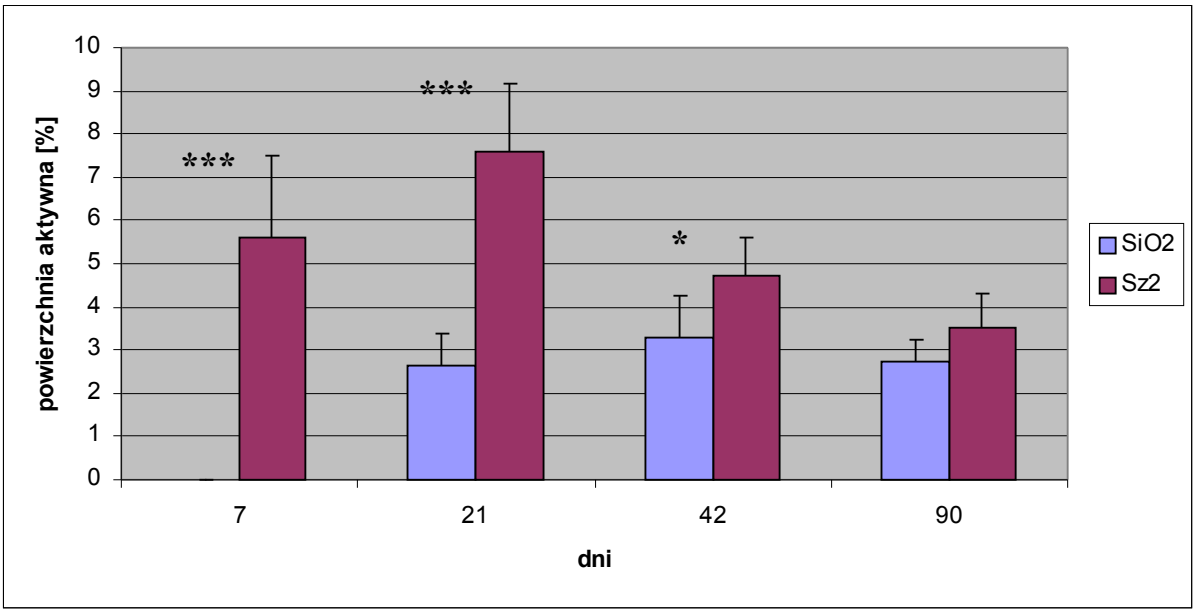
Wykres 11. Procentowy udział powierzchni tkanek wykazujących aktywność fosfatazy alkalicznej w miejscach wszczepów szkieł v-SiO_2 i Sz2.
*p<0.05, **p<0.01



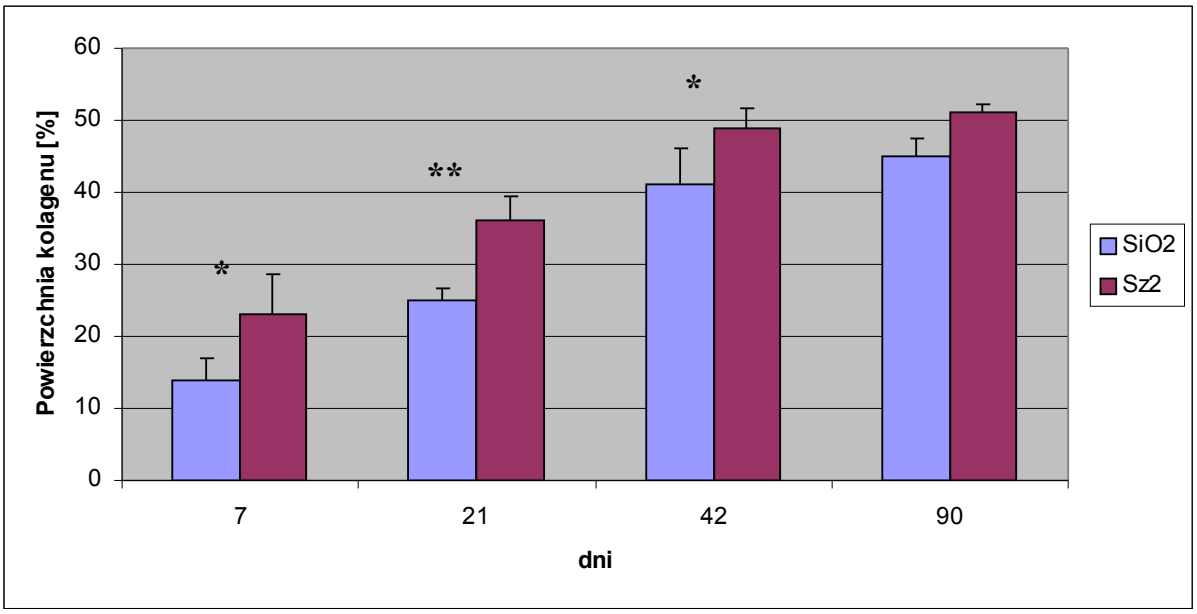
Wykres 12. Procentowy udział powierzchni tkanek wykazujących aktywność winianoopornej fosfatazy kwaśnej w miejscach wszczepów szkieł v-SiO_2 i Sz2.
*p<0.05, **p<0.01



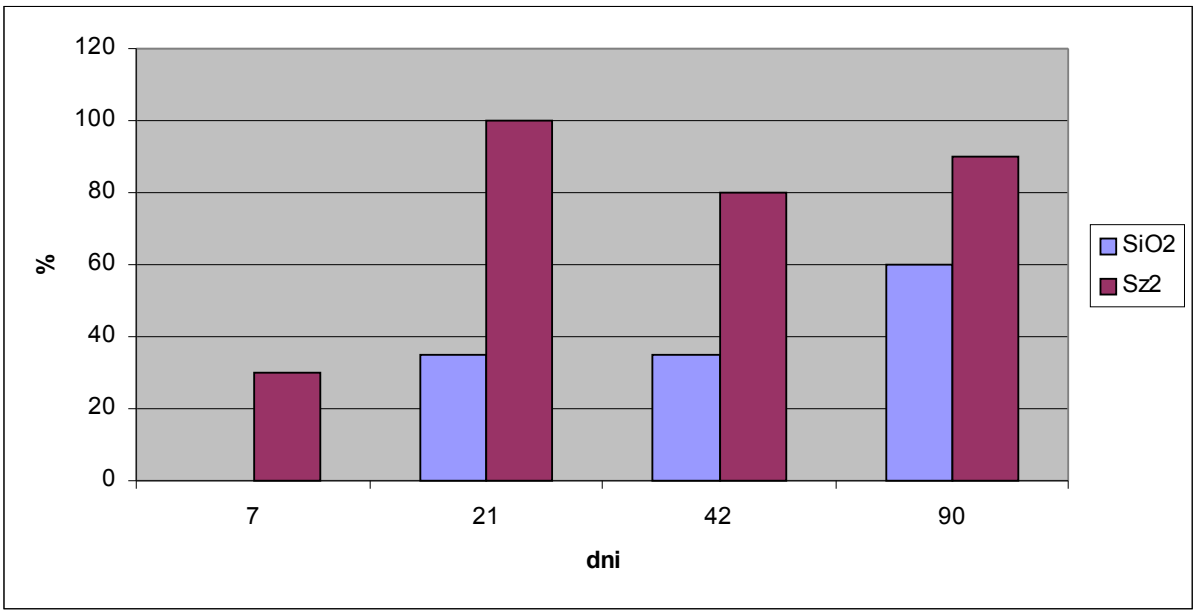
Wykres 13. Procentowy udział powierzchni tkanek wykazujących obecność jonów wapnia w miejscach wszczepów szkieł v-SiO_2 i Sz2.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

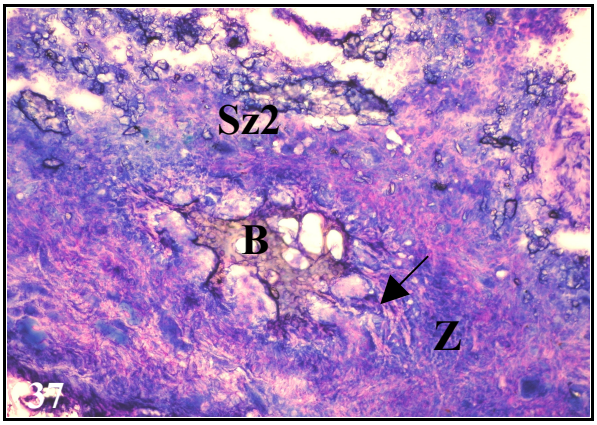


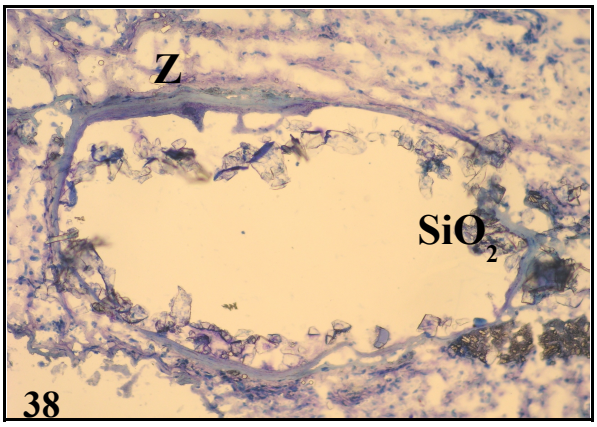
Wykres 14. Procentowy udział powierzchni tkanek wykazujących obecność kolagenu w miejscach wszczepów szkieł Sz2 i v-SiO_2.
*p<0.05, **p<0.01



Wykres 15. Procentowy udział wycinków tkankowych ze wszczepami szkieł v-SiO_2 i Sz2, w których stwierdzono regenerację tkanki kostnej.
N=10 w przypadku wszczepów Sz2
N=8 w przypadku wszczepów v- SiO_2



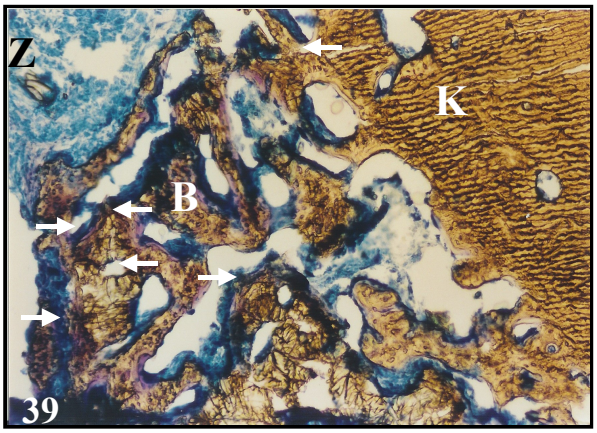




3

Fig.37.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu biomateriału Sz2. Widoczne formujące się *de novo* na podłożu mezenchymatycznym beleczki kostne (strzałka). Seria 7-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.38.
Przekrój przez skupisko granul szkła v-SiO_2 i otaczającą je formującą się dopiero tkankę ziarninową. Seria 7-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.



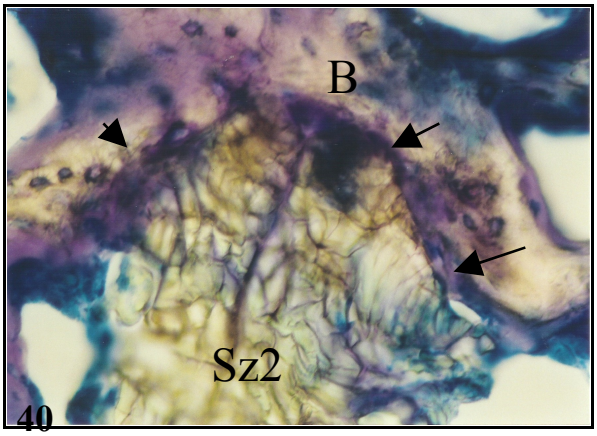
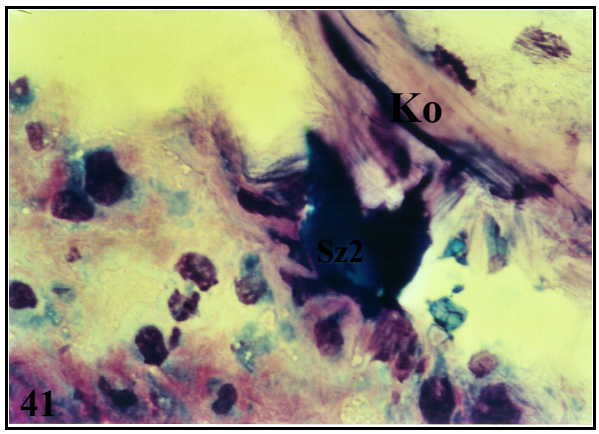


Fig.39.
Przekrój przez pozostały po zabiegu fragment kości i miejsce wszczepu bioszkła Sz2. Tkankę ziarninową zastępują nowo powstające beleczki kostne. Zwraca uwagę wtopienie ziaren biomateriału w strukturę beleczek (strzałki). Seria 21-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.40.
Przekrój przez ziarno bioszkła Sz2 i obrastającą go beleczkę kostną. Liczne komórki widoczne na styku tych dwóch faz (strzałki). Seria 21-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 40x.



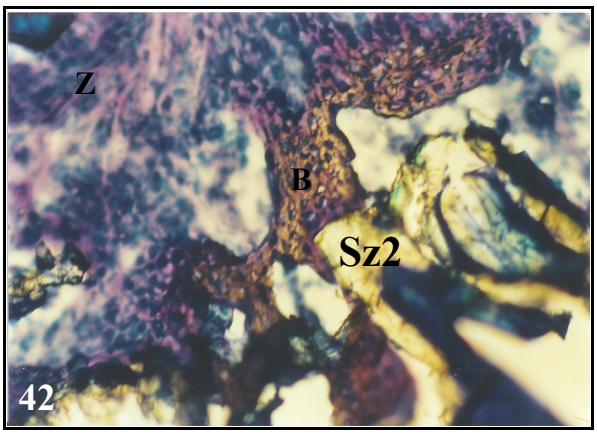
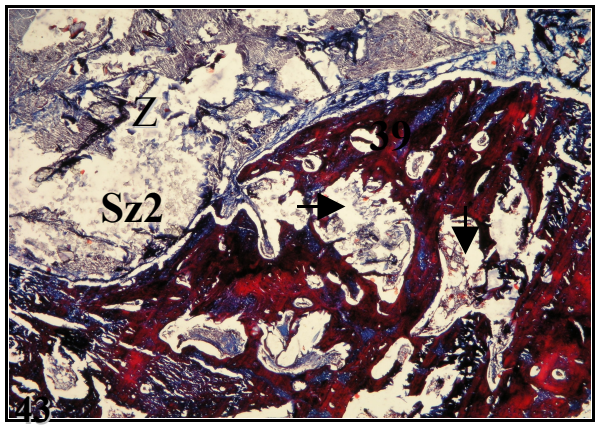


Fig.41.
Przekrój przez granulę bioszkła Sz2 i ziarninę powstającą wokół wszczepu. Widoczne umocowanie bioszkła białkami macierzy pozakomórkowej (włókna kolagenowe) i przyleganie komórek ziarniny do powierzchni bioszkła. Seria 7-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 100x.

Fig.42.
Przekrój przez wszczep bioszkła Sz2, ziarninę i różnicującą się na styku tych dwóch faz beleczkę kostną. Seria 21-dniowa. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.



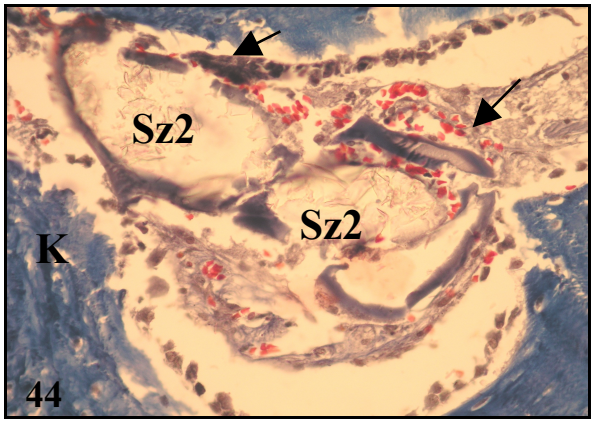
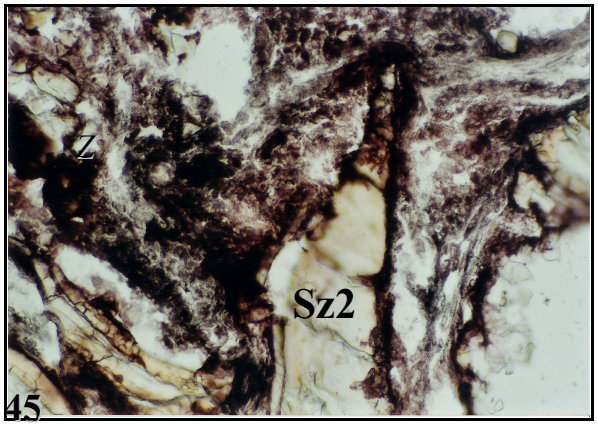


Fig.43.
Przekrój przez tkankę ziarninową i nowo powstałą kość w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Tkanka kostna zastępuje stopniowo tkankę ziarninową, stąd duża ilość bioszkła zamkniętego w strukturach kości (strzałki). Seria 90-dniowa. Barwienie histologiczne Massona-Goldnera. Powiększenie obiektywu 4x.

Fig.44.
Przekrój przez nowo powstałą kość w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Fragmenty bioszkła zamkniętego w strukturach kości służą jako podłoże komórkom szpikowym i osteoblastom (strzałki). Seria 90-dniowa. Barwienie histologiczne Massona-Goldnera. Barwienie histologiczne Pappenheima. Powiększenie obiektywu 20x.



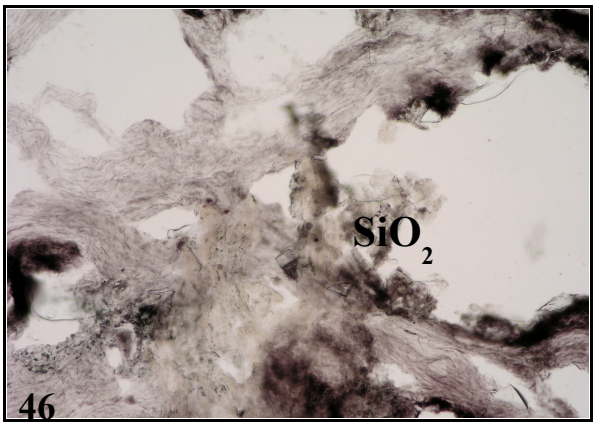
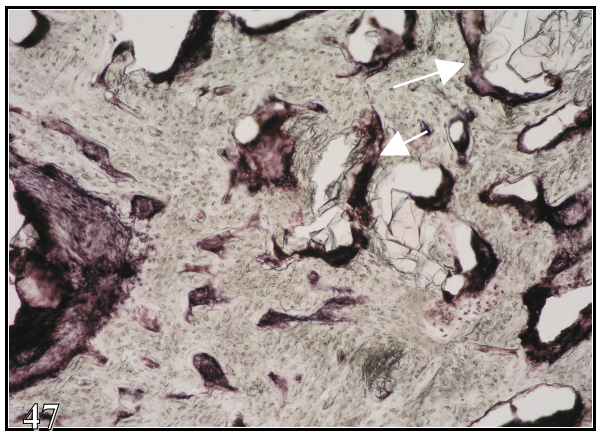


Fig.45.
Przekrój przez tkankę ziarninową otaczającą wszczep bioszkła Sz2. Widoczne pęknięcia i bruzdy w biomateriale wypełniane przez komórki wykazujące wysoką aktywność enzymatyczną. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.46.
Przekrój przez tkankę ziarninową otaczającą wszczep szkła v-SiO_2. Widoczne tylko nieliczne komórki wykazujące wysoką aktywność enzymu. W tkance otaczającej granule krzemionki przeważają elementy włókniste. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 10x.



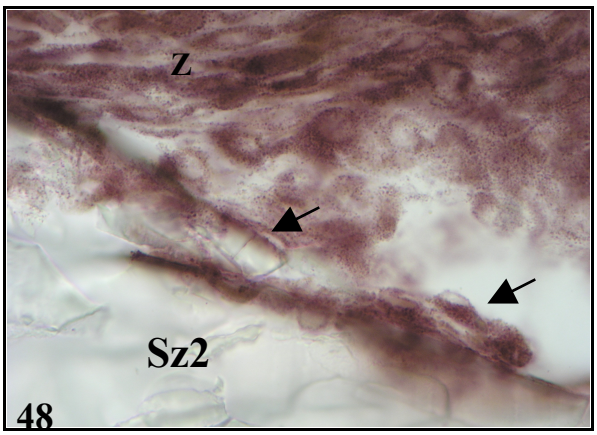
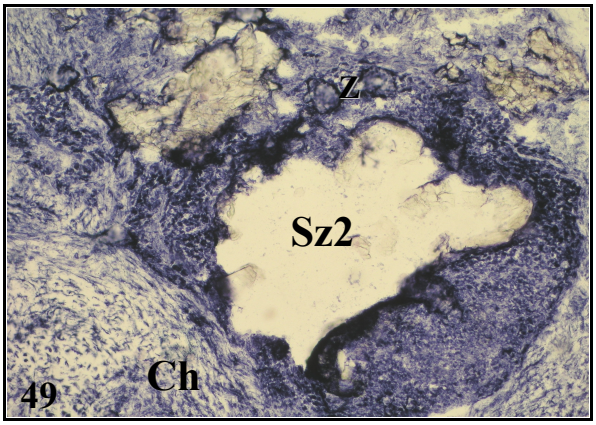


Fig.47.
Przekrój przez tkankę kostną regenerującą w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Na powierzchni struktur kostnych i fragmentów bioszkła (strzałki) widoczne komórki wykazujące wysoką aktywność enzymatyczną. Seria 42-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 4x.

Fig.48.
Przekrój przez tkankę ziarninową otaczającą wszczep bioszkła Sz2. Na powierzchni bioszkła widoczne przylegające komórki o morfologii osteoblastów, wykazujące wysoką aktywność oznaczanego enzymu (strzałki). Seria 90-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu OCC. Powiększenie obiektywu 100x.



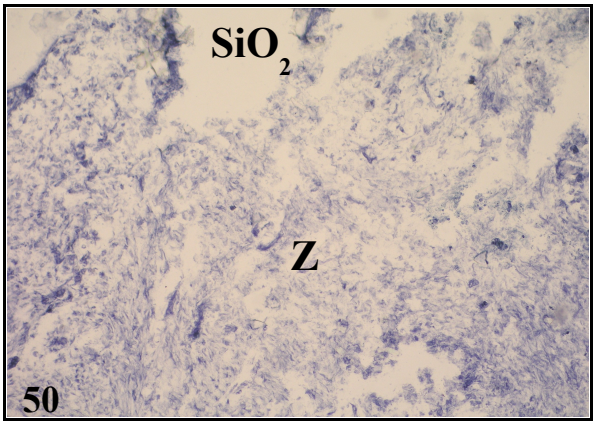
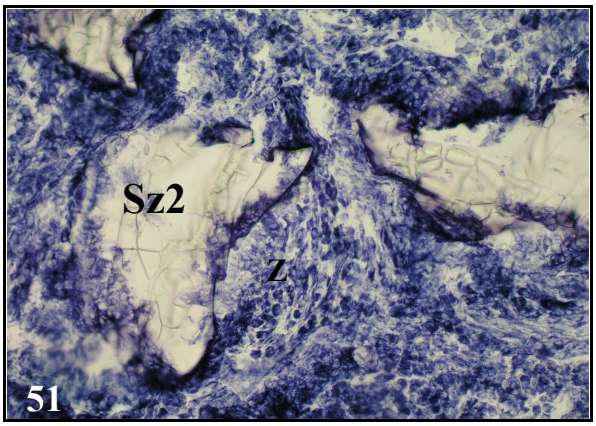


Fig.49.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Komórki ziarniny otaczające granule bioszkła wykazują wysoką aktywność badanego enzymu. W sąsiedztwie bioszkła widoczna tkanka chrzęstna. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu G6PDH. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.50.
Przekrój przez tkankę ziarninową otaczającą wszczep szkła v-SiO_2. Tkanka tworząca się w miejscu wszczepu ma stosunkowo luźną strukturę i wykazuje jedynie umiarkowane nasilenie reakcji. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu G6PDH. Powiększenie obiektywu 10x.



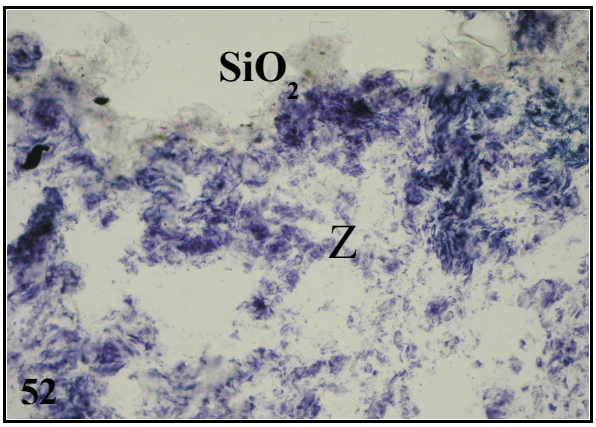
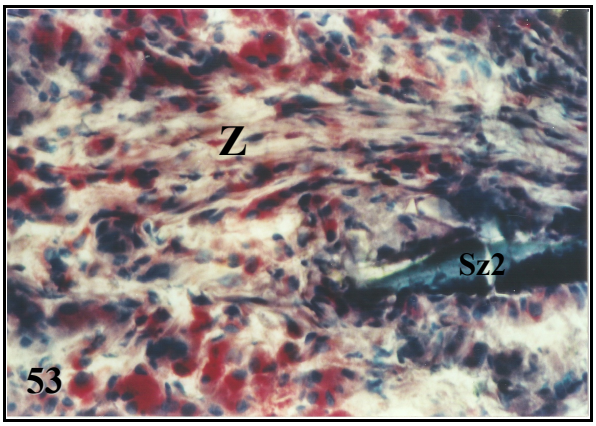


Fig.51.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Komórki ziarniny otaczające granule bioszkła wykazują wysoką aktywność badanego enzymu. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu NADHDH. Powiększenie obiektywu 20x.

Fig.52.
Przekrój przez tkankę ziarninową otaczającą wszczep szkła v-SiO_2. Tkanka tworząca się w miejscu wszczepu ma stosunkowo luźną strukturę i w większości wykazuje umiarkowane nasilenie reakcji. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu NADHDH. Powiększenie obiektywu 20x.



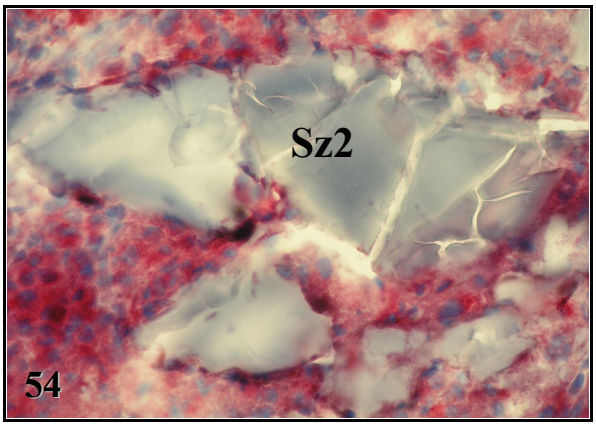
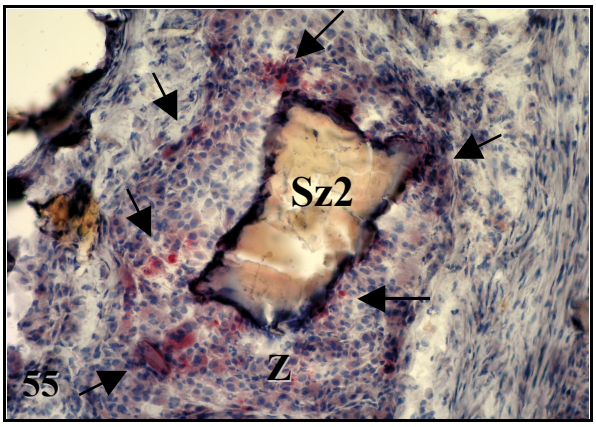


Fig.53.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Wśród komórek ziarniny liczne komórki o morfologii makrofagów i wysokiej aktywności fosfatazy kwaśnej. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 40x.

Fig.54.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Granule bioszkła Sz2 otoczone aktywnymi komórkami. Seria 90-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu FK. Powiększenie obiektywu 40x.

.



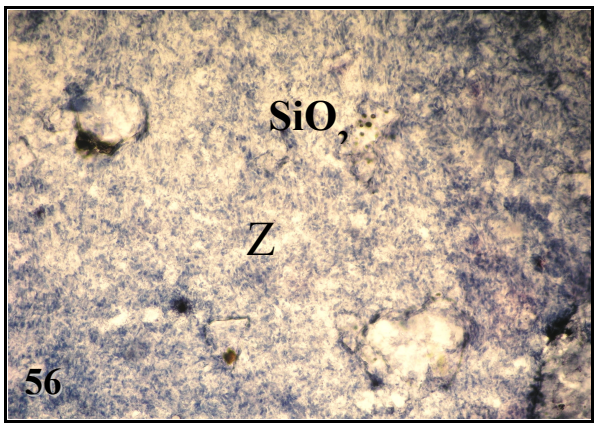
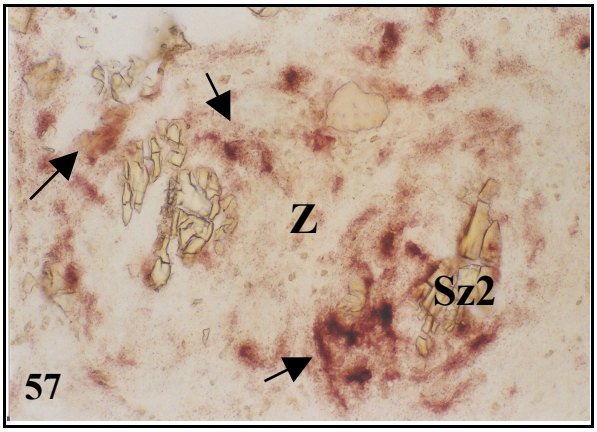


Fig.55.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu bioszkła Sz2. Wśród komórek ziarniny komórki wykazujące aktywność fosfatazy kwaśnej winianoopornej (strzałki). Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu TRAP. Powiększenie obiektywu 20x.

Fig.56.
Przekrój przez tkankę ziarninową w miejscu wszczepu szkła v-SiO_2. Po dodaniu winianu nastąpiło niemal całkowite wygaszenie aktywności fosfatazy kwaśnej Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność enzymu TRAP. Powiększenie obiektywu 20x.



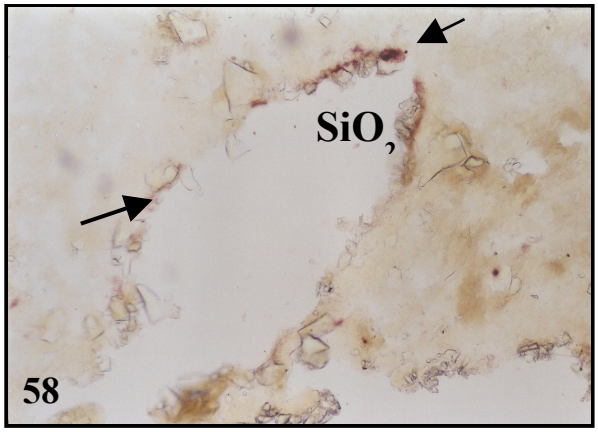
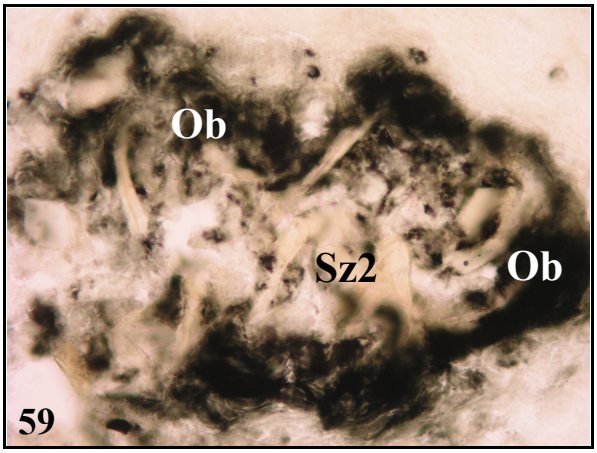


Fig.57.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2.. Wokół granul Sz2 dobrze rozwinięta tkanka ziarninowa. Na styku z drobinami bioszkła liczne komórki wykazujące wysoką aktywność enzymu (strzałki). Seria 21-dniowa Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.58.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału SiO_2. Granule szkła słabo umocowane w tkance, nieliczne komórki wykazujące wysoką aktywność enzymu. Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 10x.



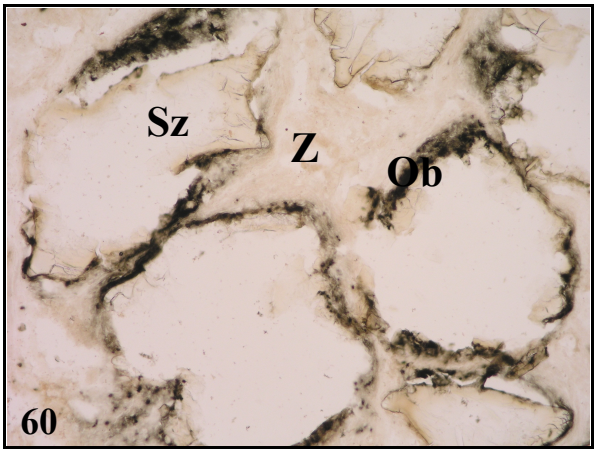
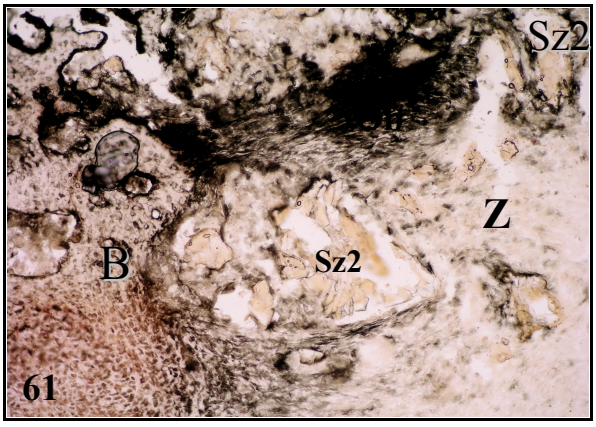


Fig.59.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Wokół granul Sz2 liczne komórki wykazujące bardzo wysoką aktywność enzymu. Widoczna dezintegracja biomateriału. Seria 90-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 40x.

Fig.60.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Wokół granul bioszkła liczne komórki wykazujące wysoką aktywność enzymu. Seria 42-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 10x.



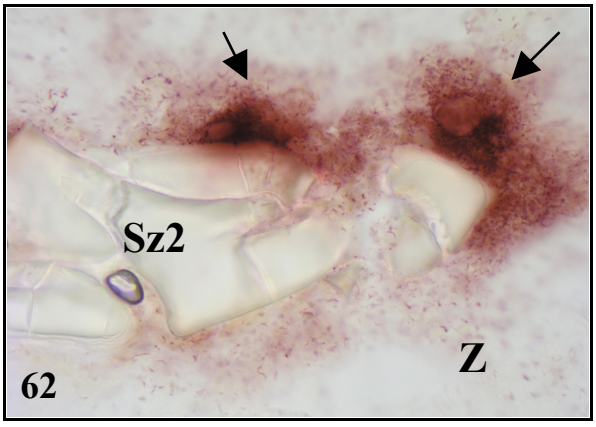
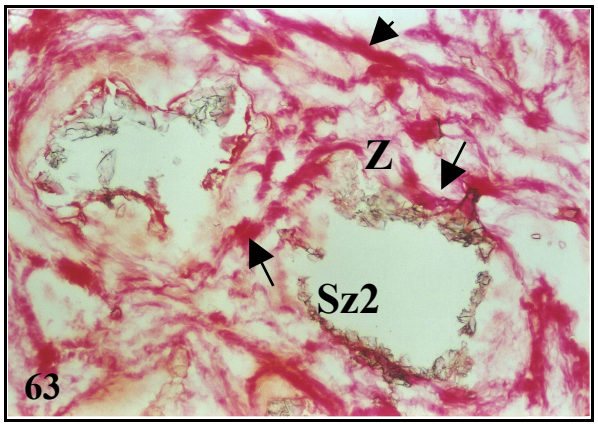


Fig.61.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. W sąsiedztwie granul Sz2 liczne komórki wykazujące bardzo wysoką aktywność enzymu. Widoczna tworząca się tkanka kostna. Seria 42-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.62.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Na powierzchni granul bioszkła komórki o morfologii osteoblastów wykazujące bardzo wysoką aktywność enzymu (strzałki). Trwa intensywny proces wydzielniczy, na co wskazuje obfita ilość pęcherzyków wokół komórek. Seria 42-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność FA. Powiększenie obiektywu 100x.



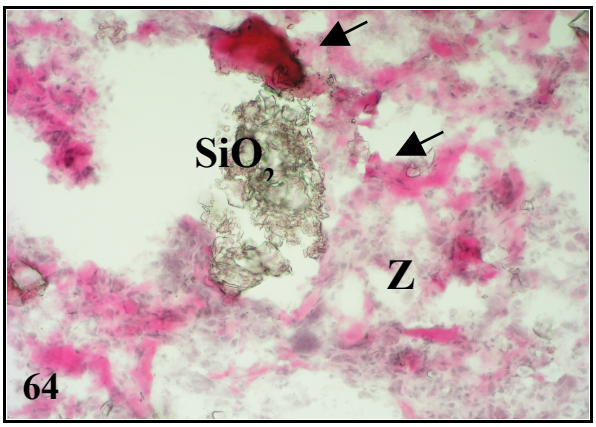
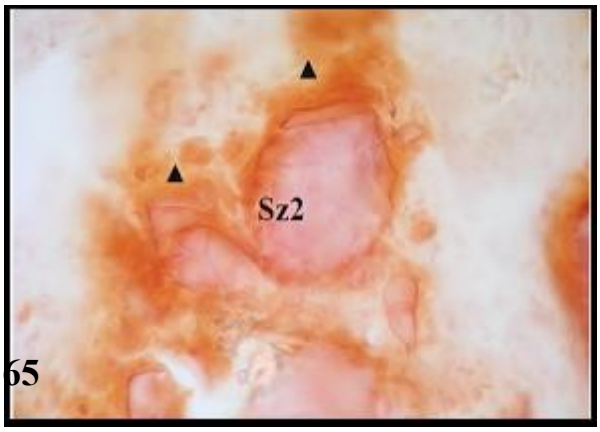


Fig.63.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Duża ilość kolagenu (strzałki) odłożonego w tkance w sąsiedztwie granul Sz2, nie tworzy on jednak izolującej torebki łącznotkankowej. Seria 21-dniowa. Reakcja van Giesona wykrywająca kolagen. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.64.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału SiO_2. Granule szkła słabo umocowane w tkance, mniejsza w stosunku do Sz2 produkcja kolagenu (strzałki). Seria 21-dniowa. Reakcja van Giesona wykrywająca kolagen. Powiększenie obiektywu 10x.



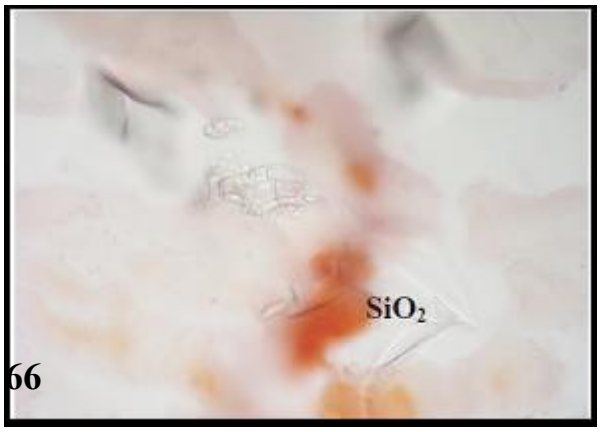
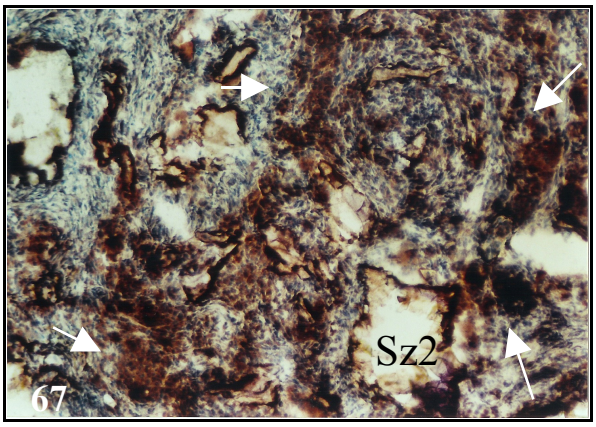


Fig.65.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Wysokie nasilenie reakcji wykazującej obecność jonów wapniowych. Seria 42-dniowa. Reakcja alizarynowa ARS. Powiększenie obiektywu 40x.

Fig.66.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału SiO_2. Stosunkowo niewysokie nasilenie reakcji wykazującej obecność jonów wapniowych. Seria 42-dniowa. Reakcja alizarynowa ARS. Powiększenie obiektywu 40x.



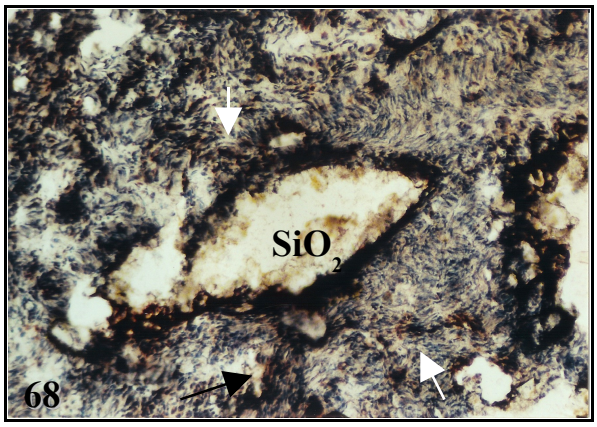


Fig.67.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału Sz2. Wysokie nasilenie reakcji wykazującej aktywność markerowego enzymu monocytów/makrofagów (strzałki). Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność EN. Powiększenie obiektywu 10x.

Fig.68.
Przekrój przez miejsce wszczepu materiału SiO_2. Niskie nasilenie reakcji wykazującej aktywność markerowego enzymu monocytów/makrofagów (strzałki). Seria 21-dniowa. Reakcja wykrywająca aktywność EN. Powiększenie obiektywu 10x.

Dyskusja

DYSKUSJA

1. Omówienie wyników uzyskanych w badaniach biomateriałów w tkance mięśniowej.

Norma ISO 10993 pt. „Biological evaluation of medical devices
“, regulująca zasady badań biomateriałów, zaleca przeprowadzenie badań biologicznych kilkuetapowo: począwszy od badań *in vitro*, poprzez badania *in vivo* w tkankach miękkich małych zwierząt (myszy, szczury, świnki morskie, króliki) i w tkankach twardych większych zwierząt (króliki, świnie, kozy), a kończąc na badaniach klinicznych.

Bioszkła opisane w niniejszej pracy przeszły pozytywnie przez testy *in vitro*, wykazując w hodowlach makrofagów, fibroblastów i komórek kościotwórczych wysoką biokompatybilność oraz zdolność stymulowania procesów proliferacji i różnicowania się komórek [Laczka-Osyczka i wsp., 1997; Laczka-Osyczka i wsp. 1998, Menaszek i wsp., 2008]. Badania *in vivo* w tkankach miękkich były następnym krokiem w ocenie biokompatybilności i wpływu bioszkła na regenerację uszkodzonej tkanki.

Mięsień szkieletowy szczura wybrano jako model do badań, biorąc pod uwagę, że materiał, zaprojektowany wprawdzie do wypełniania ubytków kostnych, będzie miał kontakt nie tylko z tkanką kostną, ale także z otaczającymi ją tkankami miękkimi (tkanka mięśniowa, łączna, okostna), których odpowiedź immunologiczna jest ostrzejsza niż w przypadku tkanki kostnej [Ooms i wsp., 2003]. Biokompatybilność badanych materiałów oceniono na podstawie przebiegu stanu zapalnego w miejscu wszczepu oraz aktywności enzymatycznej tkanek i stopnia naprawy uszkodzonego mięśnia.

Podczas analizy mikroskopowej preparatów zawierających skrawki tkankowe poddane testom histochemicznym obserwowano obok nasilenia aktywności badanych enzymów także postępy procesu naprawy tkanek i gojenia rany.

Regeneracja mięśnia jest skomplikowanym procesem, na którego przebieg mają wpływ produkowane przez komórki zapalne cytokiny. Stan zapalny jest główną reakcją na uszkodzenie mięśnia i jest decydujący dla jego regeneracji [Tidball, 1995]. Infiltracja komórek zapalnych wkrótce po uszkodzeniu mięśnia skutkuje lokalnym wzrostem poziomu cytokin i jest istotna dla formowania nowych włókien mięśniowych [Collins i Grounds, 2001]. Centralnym mediatorem odpowiedzi zapalnej jest czynnik TNF-α produkowany przez większość aktywowanych leukocytów [Tracey i Cerami, 1990]. TNF-α pełni istotne funkcje w przebiegu zapalenia, włączając aktywację i chemotaksję leukocytów, ekspresję cząstek adhezyjnych na neutrofilach i komórkach endotelialnych oraz regulację wydzielania innych

prozapalnych cytokin [Beutler i Cerami, 1988]. Reakcja układu immunologicznego stanowi wstępną fazę procesu regeneracji [Jansen, 1999]. Początkowo jest ona spowodowana uszkodzeniem tkanki, które nierozerwalnie związane jest z samym zabiegiem implantacji, później staje się odpowiedzią na obecność ciała obcego, jakim jest implant. Stan zapalny trwa aż do skutku – wyeliminowania jego przyczyny. Efektem obecności implantu w tkance może być wydłużony czas trwania stanu zapalnego, większa aktywność komórek układu odpornościowego, jak również fibroblastów. Nadmierna produktywność fibroblastów może prowadzić do wytworzenia wokół implantu izolującej torebki łącznotkankowej, lub wypełnienia miejsca ubytku niepożądaną tkanką bliznowatą. Stąd tak istotne jest, by materiał, z którego wykonany jest implant, miał własności bioaktywne i by stymulował regenerację uszkodzonej tkanki. Do takich materiałów należą badane bioszkła nowej generacji: A2 i Sz2.

Nasilenie i charakter stanu zapalnego określono na podstawie obecności komórek ważnych dla procesów regeneracji – eozynofili i mastocytów oraz aktywności markerowego enzymu stanu zapalnego – kwaśnej fosfatazy. Obecność mastocytów i eozynofili jest czynnikiem istotnym dla procesów naprawy i przebudowy uszkodzonych tkanek. Produkowane zarówno przez mastocyty, jak i eozynofile cytokiny stymulują produkcję kolagenu przez fibroblasty [Tang i wsp., 1998; Phipps i wsp., 2002]. Czynniki wydzielane przez mastocyty działają też angiogennie, indukując tworzenie się nowych naczyń krwionośnych, niezbędnych dla zaopatrzenia nowopowstających tkanek w tlen i składniki odżywcze [Noli i Miolo, 2001; Hiromatsu i Toda, 2003]

Należy przy tym pamiętać, że wprawdzie obecność mastocytów i eozynofili jest czynnikiem niezbędnym dla procesu gojenia się, niemniej zbyt gwałtowna i nadmierna aktywność komórek tucznych, wpływająca na proliferację fibroblastów i produkcję kolagenu, może prowadzić również do powstania niekorzystnego dla procesu regeneracji zwłóknienia tkanek [Garbuzenko i wsp., 2002].

Proces regeneracji tkanek przebiegający przy współudziale mastocytów i eozynofili oraz makrofagów przebiegał podobnie wokół wszczepów z materiałami A2, RM i RMC, z maksymalną liczbą mastocytów i eozynofili w dniu 90. i niewielką - w dniu 180. Wokół materiału Sz2 po częściowym wygaszeniu napływu tych komórek już w 90 dniu, następuje nawrót zwiększonej liczebności tych komórek w serii 180-dniowej. Mniej gwałtowny, niż w przypadku pozostałych materiałów wyrzut tych komórek w pierwszej fazie gojenia świadczy o mniejszym nasileniu stanu zapalnego. Ponowny wzrost liczebności tych komórek po serii 90-dniowej może natomiast świadczyć o rozpoczęciu trzeciej, po fazie zapalenia

i fazie tkanki ziarninowej, fazy przebudowy [Werkmeister i wsp., 2001]. Proces ten w serii dłuższej niż 180 dni zapewne doprowadziłby do pełnej regeneracji tkanek miejsca wszczepu.

Proces regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych szkieletowych przebiegał szybciej w tych miejscach wszczepów, w których rozwijała się intensywnie ziarnina doprowadzająca tworzące się włosowate naczynia krwionośne. Ziarnina została utworzona z fibroblastów, komórek mezenchymatycznych i komórek nacieku zapalnego. Pobudzenie komórek do wytworzenia ziarniny (tymczasowej tkanki naprawczej) następowało dzięki cytokinom i czynnikom wzrostowym wydzielanym przez komórki obronne. Komórki ziarniny cechowały się wysokim nasileniem aktywności fosfatazy kwaśnej, enzymu hydrolitycznego zawartego w lizosomach, szczególnie obficie w komórkach fagocytujących. FK uczestniczy w rozkładzie wchłoniętego przez komórki złożonego płynu i cząstek stałych, a ponadto jest wydzielana na zewnątrz, powodując wraz z innymi enzymami lizosomalnymi rozkład obcych, złożonych substancji, o rozmiarach uniemożliwiających sfagocytowanie przez pojedyncze komórki.

Wyznacznikiem biokompatybilności i bioaktywności materiału jest brak lub pojawienie się torebki łącznotkankowej odgradzającej implant od otaczających tkanek. W przypadku otoczenia implantu torebką łącznotkankową, istotną informacją mówiącą o biokompatybilności badanego materiału jest jej grubość i skład. Udowodniono również, że istnieje korelacja między tempem odkładania się warstw torebki łącznotkankowej a stopniem resorpcji materiału [Jarcho, 1981].

Na proces gojenia się rany i tworzenia torebki łącznotkankowej mają wpływ chemiczne i fizyczne cechy materiału. Istotny jest tu zarówno skład chemiczny implantu, jak i rozpuszczalne (jony, cząsteczki) i nierozpuszczalne (fragmenty materiału) czynniki uwalniane z powierzchni implantu [Anderson i Schoen, 2004]. Wśród czynników fizycznych decydujących o odpowiedzi tkankowej na implant wymienia się jego rozmiar, kształt i topografię powierzchni [Nagase i wsp., 1991; Sugawara i wsp., 1992; Jansen, 1999]. Anderson i Schoen opisują otaczanie torebką łącznotkankową dużych granul ceramiki fosforanowej [Anderson i Schoen, 2004]. Granule o małych rozmiarach nie były odizolowane torebką łącznotkankową, wywołały natomiast intensywną reakcję zapalną, z charakterystyczną obecnością makrofagów i wielojądrowych komórek olbrzymich [van der Meulen i Koerten, 1994; Comuzzi, 2002; Yuan, 1998]. Zależność taką zaobserwowano również w przypadku badanych bioszkieł.

Materiały Sz2 i A2, będące materiałami resorbowalnymi łatwo ulegały rozpadowi na drobne fragmenty, które z kolei były łatwiej fagocytowane, a obszary, w których zostały

zresorbowane powyższe materiały ulegały całkowitej lub zaawansowanej regeneracji. Zaobserwowana wysoka aktywność enzymu FK, charakterystyczna dla fagocytów: monocytów/makrofagów i wielojądrowych komórek olbrzymich potwierdza obecność tych komórek wokół drobin biomateriału. Wokół tych materiałów nie stwierdzono obecności torebki łącznotkankowej.

Materiały RM i RMC występujące w postaci dużych ziaren zostały odizolowane od otaczających tkanek torebką łącznotkankową. Materiał RMC zamknięty w torebce łącznotkankowej ulegał powolnemu rozpadowi na drobniejsze fragmenty. Charakter procesu regeneracji zależał w dużym stopniu od wielkości odłamków biomateriałów.

Powierzchnia granul materiałów A2 i Sz2 pokrywała się białkami macierzy międzykomórkowej, w tym fibronektyny, która pośredniczy w tworzeniu połączeń między komórkami a kolagenem z otaczającej substancji międzykomórkowej. Obecność fibronektyny ułatwiała adsorpcję włókien kolagenowych oraz przyleganie komórek do powierzchni biomateriału. Schemat połączeń kolagen-komórka, w których bierze udział fibronektyna przedstawiono na Rys.1.

W miejscach wszczepów biomateriałów RM i RMC nie stwierdzono łączenia się fibronektyny z powierzchnią tych materiałów, obserwowano natomiast tworzenie się gęstych sieci włókien kolagenowych wokół większych fragmentów materiałów RM i RMC, które prowadziły do powstawania jednolitej torebki łącznotkankowej na ich powierzchni. Reakcje komórek ziarniny na obecność biomateriałów były zależne od wielkości fragmentów tych materiałów. Małe fragmenty biomateriałów były otaczane przez pojedyncze fibroblasty i komórki ziarniny, względnie przez komórki wielojądrowe utworzone z połączenia się makrofagów. Większe fragmenty biomateriałów, głównie RM i RMC, otaczane były torebką złożoną z warstw fibroblastów/fibrocytów i kolagenu. Powstanie w pełni uformowanej torebki łącznotkankowej włóknistej wokół fragmentów biomateriału obserwowano w serii 180 dniowej wokół wszczepu RMC.

O procesach naprawy świadczy pojawienie się nowych, regenerujących włókien mięśniowych oraz aktywność enzymów biorących udział w podstawowych procesach metabolicznych, jakim jest oddychanie.

W kolejnych seriach obserwowano zmniejszanie się powierzchni tkanki ziarninowej, która od swojej zewnętrznej strony zastępowana była stopniowo tkanką mięśniową. Dowodem na regenerację tkanki mięśniowej jest występowanie na terenie ziarniny otaczającej biomateriały miotub – początkowego stadium tworzącego się włókna mięśniowego.

Włókna mięśniowe usytuowane blisko wszczepu biomateriału wykazywały, szczególnie w krótkich seriach eksperymentu, obniżenie aktywności enzymów utleniających G6PDH i NADDH oraz OCC. W celu oceny oddziaływania implantu na otaczające go tkanki porównywano aktywność enzymów utleniających włókien mięśniowych w bliskiej okolicy wszczepu z aktywnością tych enzymów w włóknach rozmieszczonych w większej odległości od wszczepu. Włókna mięśniowe dalszej okolicy cechowała wyższa aktywność OCC i NADDH w porównaniu do włókien rozmieszczonych przy wszczepie. Aktywność ta odpowiadała aktywności enzymów w komórkach mięśnia kontrolnego, nieuszkodzonego. Zasięg oddziaływania implantu był więc ograniczony do miejsca uszkodzenia tkanek, materiał nie wpływał na aktywność włókien mięśniowych oddalonych od implantu. Regenerujące włókna mięśniowe, a więc bliskie miejsca wszczepu, pomimo mniejszych rozmiarów swoich przekrojów cechowały się podobną aktywnością badanych enzymów utleniających, jak w pełni rozwiniętych, nieuszkodzonych włóknach mięśniowych. Testowane wszczepione biomateriały nie hamowały możliwości regeneracji tkanki mięśniowej szkieletowej.

Komórki ziarniny wykazywały wzrastającą w kolejnych seriach aktywność G6PDH w miejscach wszczepów materiałów Sz2 i RM, co świadczy o wzmożeniu procesów regeneracji. Aktywność NADDH, enzymu transportu elektronów w łańcuchu oddechowym, a więc będąca wskaźnikiem nasilenia metabolizmu, stopniowo obniżała się w komórkach ziarniny miejsc wszczepów A2, RM i RMC. Z obserwacji tych można wnioskować, że nastąpiło obniżenie tempa metabolizmu, związane prawdopodobnie z powolnym przekształcaniem się fibroblastów w ich formę spoczynkową - fibrocyty.

Aktywność OCC w komórkach ziarniny miejsc wszczepów A2, Sz2 i RM utrzymywała się na niższym poziomie w porównaniu z aktywnością G6PDH i NADDH, natomiast komórki ziarniny w miejscach wszczepu RMC wykazywały przeciętnie wyższą aktywność OCC w porównaniu z aktywnością NADDH. Materiały A2, Sz2 i RM wywołały prawdopodobnie wzrost tempa glikolizy w komórkach ziarniny. Podwyższona aktywność G6PDH świadczy o wzmożonych procesach regeneracji w tkankach otaczających implant.

Obecność biomateriałów nie wywołała wyraźnego obniżenia aktywności enzymów utleniających tj. G6PD, NADHD i OCC w tkance mięśnia szkieletowego. Stwierdzono wysoki stopień regeneracji włókien mięśniowych i tkanki łącznej w miejscu wszczepu. Wyniki badań wykazały biozgodność wszystkich czterech materiałów, przy czym najbardziej

obiecującym okazało się bioszkło Sz2. Materiał ten został wytypowany do dalszych badań nad regeneracją tkanki kostnej.

2. Omówienie wyników badań biomateriałów w tkance kostnej.

Różnego rodzaju uszkodzenia układu kostnego, spowodowane urazami lub zmianami zwyrodnieniowymi [Fourney i wsp., 2003; Kuokkanen i wsp., 2001; Schilephake, 2002; Bolder i wsp., 2001] są najczęściej występującymi dolegliwościami, do leczenia których wykorzystuje się biomateriały. Wprawdzie za tzw. złoty standard w leczeniu ubytków kostnych uznaje się transplantację homologicznej tkanki kostnej [Slooff i wsp., 1996; Paprosky i Martin, 2002], jednakże w obliczu problemów związanych z pozyskaniem odpowiedniej tkanki do przeszczepów oraz z niebezpieczeństwem przeniesienia wraz z tkanką czynników infekcyjnych [Friedlander, 2000, Gitelis i Cole, 2002], poszukuje się wciąż materiałów alternatywnych. Nadzieje na zaspokojenie coraz powszechniej występującego zapotrzebowania na substytuty tkanki kostnej wiązane są z postępem inżynierii tkankowej. Do wyhodowania trójwymiarowej tkanki, niezależnie czy w warunkach *in vitro* czy *in vivo*, niezbędne są jednak biomateriały mogące służyć jako tymczasowe podłoże dla rozmnażających się i różnicujących komórek. Materiały nowej generacji są to materiały biokompatybilne i bioresorbowalne, które w trakcie spełniania swojej wspomagającej funkcji powinny stopniowo, w miarę rozwoju tkanki, zanikać [An i wsp., 2000].

Niedoskonałość używanych od lat w chorobach układu kostnoszkieletowego materiałów wynika z tego, że tworzone z nich protezy w niczym nie są podobne do żywych tkanek: nie mają zdolności samonaprawy, uniemożliwiają transport za pomocą krwi, nie mają możliwości modyfikowania się w odpowiedzi na bodźce. Ponadto, protezy są ograniczone czasowo, zużywają się i po pewnym czasie użytkowania muszą być wymienione, co wymaga wykonania następnego zabiegu chirurgicznego. Jest to ogromny problem, zarówno dla zaawansowanych wiekiem pacjentów, u których mogą występować przeciwwskazania do ponownej operacji, jak i dla młodszych, aktywnych pacjentów.

Właściwym kierunkiem badań są więc poszukiwania bioaktywnych materiałów, które stworzą warunki do kontrolowanej regeneracji tkanek i znikną po wypełnieniu zadania. W ten sposób odchodzi się stopniowo od tradycyjnego leczenia za pomocą protez na korzyść inżynierii tkankowej.

2.1. Wpływ chemicznych i fizycznych właściwości materiału na regenerację tkanki.

Tkanka kostna jest tkanką dynamiczną, cały czas ulegającą przebudowie, dzięki czemu może dostosować się do zmieniających się warunków środowiska wewnętrznego i zewnętrznego (np. nacisków mechanicznych). Stopniowa resorpcja biomateriału stanowiącego podłoże dla nowej, regenerującej tkanki, umożliwia przebudowę kości. Nieprzypadkowo materiałami, z którymi wiąże się duże nadzieje w nowoczesnych technikach leczenia, są bioszkła nowej generacji. Bioszkła są częściowo bioresorbowalne i składają się z pierwiastków, które uczestniczą w procesach metabolicznych i są niezbędne w procesie kościotworzenia. Produkty degradacji szkieł bioaktywnych uczestniczą w aktywacji genów komórek kościotwórczych. Uwalniane podczas resorpcji bioszkła jony krzemianowe i wapniowe są istotnym czynnikiem w regulacji siedmiu grup genów odpowiedzialnych za proliferację, różnicowanie, apoptozę i produkcję składników substancji międzykomórkowej przez osteoblasty [Xynos i wsp., 2000]. Z bioszkła Sz2, będącego przedmiotem badań własnych, w środowisku tkankowym uwalniane są jony krzemianowe, fosforanowe i wapniowe.

Jony krzemianowe, obecne w żelu tworzącym się na powierzchni bioszkła w środowisku płynów ustrojowych, są potencjalnym mitogenem dla komórek osteoblastycznych, wpływają na zwiększenie syntezy DNA, wzrost aktywności alkalicznej fosfatazy i wydzielania osteokalcyny [Keeting i wsp., 1992]. Badania Vrouwenveldera dowiodły, że osteoblasty dzielą się szybciej na powierzchni bioszkła niż syntetycznego hydroksyapatytu [Vrouwenvelder i wsp., 1993]. Rolę krzemu potwierdziły też badania na kurczętach i szczurach, w których wykazano, że kość rośnie szybko przy odpowiedniej podaży krzemu, podczas gdy brak tego pierwiastka działa hamująco na wzrost kości [Carlisle, 1997]. W badaniach denzytometrycznych wykazano, że wzbogacona w krzem dieta wzmacnia kości zwiększając ich gęstość mineralną [Jugdaohsingh i wsp., 2004]. Krzem ma również wpływ na tworzenie wiązań poprzecznych w cząsteczkach koleganu oraz polisacharydów, które umożliwiają powstawanie ścisłych wiązań pomiędzy mineralną warstwą apatytu a włóknami kolagenowymi [Valerio i wsp., 2004]. Liczne badania potwierdziły istotną rolę krzemu w procesie regeneracji tkanki i osteogenezy [Cao i Hench, 1996].

W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy użyto szkła krzemionkowego jako materiału referencyjnego dla badanego bioszkła Sz2. Mimo wysokiej zawartości krzemu, wyniki uzyskane dla tego materiału są dużo gorsze niż dla Sz2. Lepsze efekty dla Sz2 niż

v-SiO_2 wynikają między innymi z większej dostępności biologicznej krzemu z bioszkła, niż ze szkła krzemionkowego (niska rozpuszczalność v-SiO_2 ze względu na stabilność struktury).

Wpływ na różnicowanie się komórek i stymulację osteoblastów mają również fosfor i wapń. Fosfor nieorganiczny odgrywa rolę sygnału zapoczątkowującego proces różnicowania się komórek osteoblastycznych oraz mineralizacji [Lossdörfer i wsp., 2004; Piattelli i wsp.,1995]. Jony wapnia uwalniane z powierzchni bioszkła powodują lokalne przesycenie środowiska i umożliwiają formowanie się hydroksyapatytu. Alkalizacja środowiska spowodowana rozpuszczaniem bioszkła prowadzi do zmniejszenia rozpuszczalności i, w efekcie, krystalizacji apatytu [Saalfeld i wsp., 1994]. Nieco wyższe pH działa ponadto stymulująco na proliferację osteoblastów i chondrocytów [Valerio i wsp., 2004].

Bioszkła można syntezować różnymi metodami, najważniejsze z nich to: klasyczna (topienie zestawów surowcowych) i chemiczna synteza zol-żel. Bioszkła produkowane tą ostatnią metodą wykazują większą czystość chemiczną i jednorodność oraz wyższy współczynnik degradacji/resorpcji w porównaniu do bioszkieł produkowanych metodą klasyczną [Deligianni i wsp., 2001; Gentleman i Polak, 2006]. Metoda zol-żel gwarantuje uzyskanie rozwinięcia powierzchni i zachowanie na powierzchni biomateriału grup silanolowych Si-OH, sprzyjających nukleacji i krystalizacji hydroksyapatytu - parametrów, decydujących bezpośrednio o bioaktywności materiałów. Stopień rozwinięcia powierzchni zależy także od postaci, w jakiej występuje materiał. Uzyskane metodą zol-żel bioszkło Sz2, zastosowane w niniejszym eksperymencie w postaci granul, wykazuje znacznie wyższy stopień rozwinięcia powierzchni od granul uzyskanych metoda klasyczną. Dzięki obecności grup silanolowych Si-OH na powierzchni bioszkła możliwa jest krystalizacja apatytu. Grupy Si-OH, hydrolizując w kontakcie z płynami tkankowymi, tworzą warstwę uwodnionego żelu krzemionkowego [Wilson i wsp, 1993]. Początkowo powierzchnia implantu ładuje się ujemnie przez powstanie grup SiO^-. Powierzchnia ta przyciąga jony Ca^{2+}, a następnie grupy fosforanowe PO_4^{3-}. Z otaczającego płynu tkankowego sorbowane są również jony węglanowe. W wyniku przyciągania jonów przez powierzchnię implantu następuje lokalne przekroczenie iloczynu rozpuszczalności hydroksyapatytu i następuje jego krystalizacja na powierzchni bioszkła. W efekcie grupy silanolowe tworzą centra, na których krystalizuje hydroksyapatyt [Kim i wsp, 2006]. Powstała warstwa hydroksyapatytu jest warstwą, za pośrednictwem której następuje wiązanie biomateriału z tkanką kostną.

W porównaniu do szkieł Hencha szkło Sz2 pozbawione jest składnika sodowego. Obecność tlenku sodu w szkle z układu CaO-SiO_2 skutkuje obniżeniem jego odporności

chemicznej. W warunkach *in vitro* takie bioszkło wymienia jony Na^+ i Ca^{2+} ze swojej struktury na jony H^+ z roztworu i podnosi jego pH, co sprzyja krystalizacji apatytu. W warunkach *in vivo* dodatek Na_2O wywołuje jednak powstawanie zbyt grubej warstwy żelu krzemionkowego, powodując osłabienie wiązania implantu z kością [Sindut, 2006].

Badania mineralizacji tkanki wokół wszczepionych biomateriałów Sz2 i v-SiO_2 przeprowadzono za pomocą reakcji alizarynowej. Odczynnik alizarynowy użyto ze względu na jego specyficzność i czułość w stosunku do jonów wapniowych [Kiernan, 1992]. Stwierdzono obecność soli wapnia w tkankach otaczających bioszkło Sz2 we wszystkich seriach eksperymentu, z największym nasileniem w serii 21-dniowej. W preparatach kontrolnych z wszczepionym szkłem v-SiO_2 nie wykazano pozytywnej reakcji w serii 3 i 7-dniowej, a w kolejnych seriach była ona znacznie mniejsza niż w przypadku bioszkła.

Vogel w swoich badaniach regeneracji kości przy użyciu bioszkła, w których oceniał mineralizację tkanki za pomocą metody histochemicznej von Kossa, również stwierdził wysoki stopień mineralizacji tkanek w obecności bioszkła. W jego badaniach wyraźną mineralizację wokół wszczepów stwierdzono w dwudziestym ósmym dniu eksperymentu [Vogel i wsp., 2001]. Tak niewielką różnicę można wytłumaczyć innym składem chemicznym i właściwościami bioszkła użytego w tych badaniach.

W procesie powstawania nowej tkanki kostnej ważną rolę odgrywają fibroblasty. Fibroblasty, obok komórek stanu zapalnego, są składnikiem tymczasowej tkanki ziarninowej tworzącej się w miejscu uszkodzenia. Produkują zarówno elementy substancji międzykomórkowej, jak i degradujące ją enzymy, dzięki którym możliwa jest przebudowa tkanki. Wydzielają również cytokiny i czynniki wzrostowe. Podczas regeneracji tkanki kostnej wydzielają czynniki stymulujące wzrost osteoblastów, a w razie potrzeby same również mogą różnicować się w osteoblasty [Ostrowski, 1995; Hirata, 2007]. O aktywności fibroblastów może świadczyć ilość wyprodukowanego przez nie kolagenu. Obecność fibroblastów i kolagenu jest jednym z kryteriów stosowanych w ocenie wpływu materiału na wzrost nowej tkanki kostnej [Piatelli, 1995; Tworzydło, 2000]. Zastosowana w badaniach własnych metoda van Giesona wykazała obecność dużych ilości kolagenu w miejscach wszczepów biomateriałów, w szczególności Sz2. Największe ilości kolagenu stwierdzono w obecności bioszkła Sz2 w seriach 21 i 42-dniowej, w których obserwowano również intensywną budowę beleczek kostnych.

Istotnym wskaźnikiem bioaktywności materiału jest tempo, w jakim postępuje regeneracja tkanki kostnej i ubytek wypełniany jest nowymi beleczkami kostnymi.

W badaniach własnych, w niektórych przypadkach obserwowano pojawienie się pierwszych beleczek w obecności bioszkła Sz2 już w 7 dniu, a najpóźniej zaś w dniu 21. W seriach 42 i 90-dniowych obserwowano jeszcze obecność tkanki ziarnowej wokół zachowanej części bioszkła, duża część ubytku wypełniona była jednak nową tkanką kostną. W badaniach opisanych przez Le Guehenneca i wsp., w których porównano wpływ różnych materiałów (takich jak hydroksyapatyty, ceramika fosforanowa, koral) na czas potrzebny do wytworzenia nowej kości, równie dobre rezultaty uzyskano tylko dla niektórych materiałów i to wtedy, gdy ich działanie połączono z działaniem czynników wzrostu lub opłaszczono je białkiem [Le Guehennec i wsp., 2004]. Wyniki podobne do uzyskanych w badaniach własnych przedstawiono w pracy opisującej eksperyment przeprowadzony na królikach z zastosowaniem bioaktywnego szkła 52s i 55s. W siódmym dniu po zabiegu w miejscach wszczepów obserwowano obecność obfitej tkanki ziarninowej z licznymi proliferującymi naczyniami włosowatymi. Na obrzeżach gojącego się ubytku obserwowano natomiast pojawiające się już beleczki kostne. W dwudziestym ósmym dniu tkanki wokół wszczepów cechowała wyraźna mineralizacja, a liczne szczeliny degradującego się biomateriału wypełniane były przez tkankę łączną [Vogel i wsp., 2001]. W innych badaniach porównano wpływ granulek hydroksyapatytu (HAp) oraz bioaktywnego szkła Biogran na odbudowę ubytków wykonanych w żuchwie u psów. Obydwa materiały poprawiały regenerację tkanki kostnej w wykonanych ubytkach już po miesiącu, jednak większy przyrost kości występował po wszczepieniu bioszkła. Zauważono także, że granulki hydroksyapatytu zostały oddzielone od nowej kości tkanką włóknistą, podczas gdy bioszkło wiązało się z nią bezpośrednio. W badaniach tych stwierdzono różnicowanie komórek mezenchymatycznych w kierunku osteoblastów w obecności bioszkła, czego nie obserwowano w przypadku hydroksyapatytu [Schepers i wsp.,1991]. Podobnie w badaniach porównawczych hydroksyapatytu i bioszkła Hencha, które przeprowadził Oonishi i wsp., zauważono szybszy przyrost beleczek kostnych w ubytkach wypełnionych bioszkłem. Zaobserwowano również, że bioszkło wiązało się z tkanką kostną, co nie było widoczne w przypadku hydroksyapatytu [Oonishi i wsp., 1997].

Badane bioszkło Sz2 wykazało właściwości biologiczne podobne do materiałów opisanych przez cytowanych wyżej autorów. Wokół implantu bioszkła bardzo szybko powstawała tkanka ziarninowa, w której pojawiały się liczne włosowate naczynia krwionośne, niezbędne dla prawidłowego rozwoju kości i przebiegu procesu regeneracji [Carano i Filvaroff, 2003; Kanczler i Oreffo, 2008]. Na rozwój nowych naczyń krwionośnych niewątpliwie wpływ miała obecność mastocytów i eozynofili, szczególnie licznych wokół bioszkła Sz2 w serii 21-dniowej.

Pierwsze beleczki w ubytku kostnym wypełnionym Sz2 pojawiły się już w 7., a najpóźniej w 21. dniu po zabiegu. W przypadku materiału referencyjnego, czyli czystej krzemionki, pierwsze beleczki pojawiły się dopiero po upływie 21-dni i tylko w niewielkiej liczbie przypadków.

Proces kostnienia w obecności bioszkła Sz2 przebiegał w większości badanych przypadków na podłożu mezenchymatycznym, a tylko w nielicznych przypadkach wytwarzała się tkanka chrzęstna, która w następnym etapie ulegała przekształceniu w tkankę kostną. Występowanie kostnienia na podłożu tkanki chrzęstnej powodowane jest przez zbyt niską podaż tlenu. Powodem takiej sytuacji może być uszkodzenie naczyń krwionośnych podczas zabiegu chirurgicznego [Aslan i wsp., 2004] lub niewystarczające tempo powstawania nowych naczyń włosowatych w tworzącej się tkance ziarninowej. Przewaga kostnienia na podłożu mezenchymatycznym wskazuje na to, że wypełnienie ubytku kostnego materiałem Sz2 w postaci granul umożliwia swobodną migrację komórek i wymianę gazową.

Jak wspomniano już wcześniej, na zachowanie komórek i odpowiedź tkankową znaczący wpływ ma topografia powierzchni biomateriału. Badania Greena i współpracowników wykazały, że mikrostruktura biomateriału ma wpływ na proliferację i gęstość przylegających fibroblastów [Green i wsp., 1994]. Bazując na tych obserwacjach można się spodziewać, że krystalizacja hydroksyapatytu, zmieniająca mikrostrukturę powierzchni bioaktywnego materiału, będzie również wpływać na przyleganie i, w konsekwencji, różnicowanie się komórek. Zaobserwowano też, że powierzchnia bioaktywnej ceramiki, ze względu na rodzaj absorbowanych białek, promuje proliferację osteoblastów.

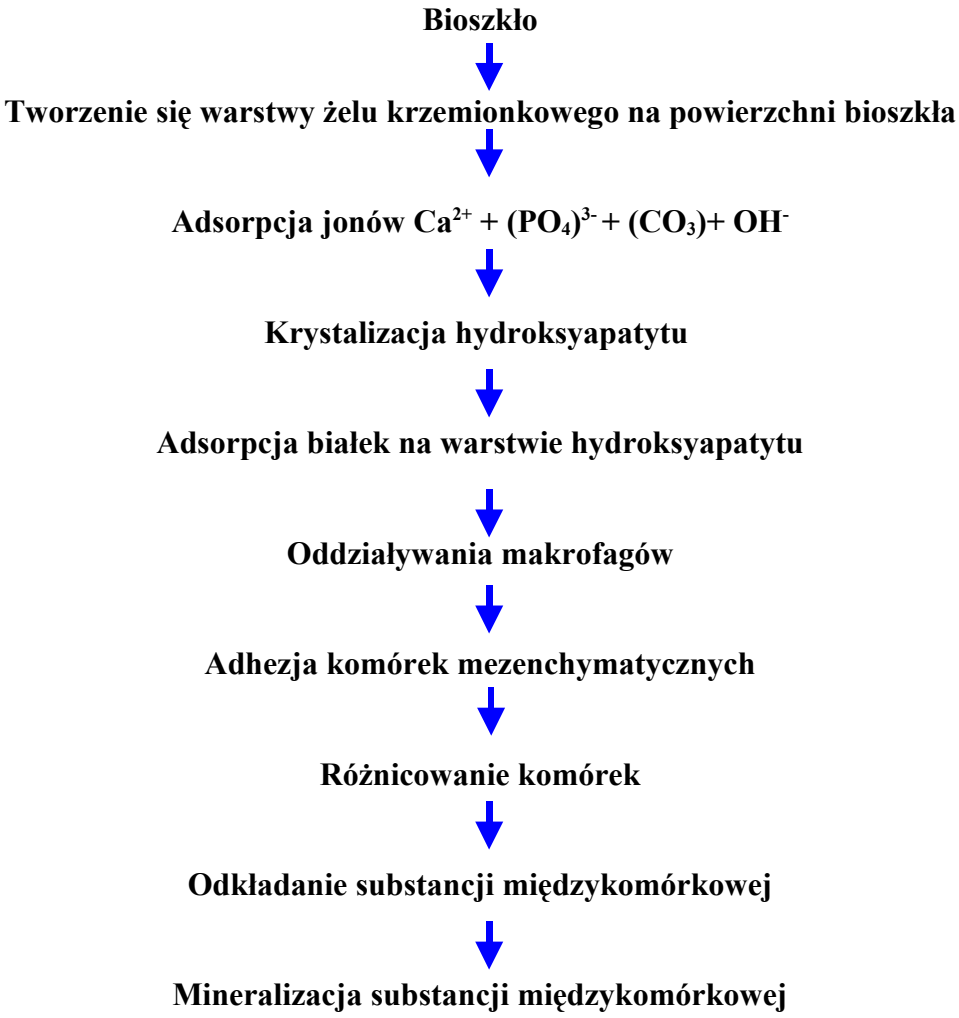
Stopień rozwinięcia powierzchni zależy od postaci, w jakiej występuje materiał. Granule, zastosowane w niniejszym eksperymencie, wykazują znacznie wyższy stopień rozwinięcia powierzchni od porowatych spieków [Sindut, 2006]. Jak sprzyjająca adhezji komórek jest powierzchnia Sz2 widać na preparatach histologicznych, gdzie komórki ciasno przylegają do powierzchni granul biomateriału i wykorzystują każdą szczelinę i pęknięcie, żeby się tam wcisnąć.

Bioaktywność bioceramiki jest efektem reakcji zachodzących na granicy faz biomateriał/płyn ustrojowy/tkanka. Prowadzą one do utworzenia wiązania biomateriału z kością za pośrednictwem warstwy hydroksyapatytu, która tworzy się na jego powierzchni,

bez tworzenia otaczającej implant tkanki włóknistej. Powstałe połączenie cechuje bardzo wysoka wytrzymałość, często przekraczająca wytrzymałość zarówno kości jak i implantu [Hench, 1991; Hench, 1994].

Przebieg procesów zachodzących na powierzchni biomateriałów ceramicznych, zaproponowany przez Hencha, przedstawiono na schemacie (Rys.2.).

Rys.2. Schemat przebiegu procesów zachodzących na powierzchni biomateriałów ceramicznych wg Hencha [Hench, 1991].



2.2. Badania histoenzymatyczne.

Na wstępie trzeba zaznaczyć, że porównawcza ocena aktywności enzymatycznej tkanek wokół implantów Sz2 i SiO_2 może być obarczona pewnym błędem, co wynika z różnych właściwości fizycznych i chemicznych tych materiałów. Materiał Sz2 jako materiał bioaktywny i resorbowalny dość szybko obrastał tkanką, najpierw ziarninową, a później kostną. Ponieważ materiał ten był dobrze „umocowany" w tkankach, na preparatach uzyskanych z kości wypełnionych tym implantem bez trudu można było obserwować miejsca styku biomateriał/tkanka. Szkło krzemionkowe v-SiO_2, jako materiał inertny i słabo rozpuszczalny, nie było dobrze umocowane i podczas wykonywania skrawków oddzielało się od tkanki. Już sam wygląd skrawków tkankowych, ze znacznie słabiej rozwiniętą tkanką przy wszczepach v-SiO_2, bez wykonania reakcji histologicznych i histochemicznych oraz wszelakich pomiarów, daje nam wiele informacji o właściwościach obu materiałów i ich wpływie na regenerację tkanki kostnej. Z niektórych wycinków kostnych z wszczepionym materiałem v-SiO_2 nie udało się nawet uzyskać skrawków tkankowych nadających się do analizy.

Demonstracja aktywności fosfatazy alkalicznej jest prawdopodobnie najczęściej używanym testem wykazującym aktywność osteoblastów [Dedhar i wsp., 1989; Pagani i wsp., 2005, Tsigkou i wsp., 2009]. Aktywność FA wskazuje na różnicowanie się komórek w aktywne osteoblasty, które są odpowiedzialne za tworzenie kości: syntetyzują prawie wszystkie składniki macierzy kostnej i kierują procesem jej mineralizacji.

Fosfataza alkaliczna odgrywa istotną rolę w procesie wydzielania i mineralizacji, stąd wysoka aktywność tego enzymu stosowana jest jako marker komórek osteoinduktywnych [Swaminathan, 2001]. W badaniach własnych aktywność fosfatazy alkalicznej w tkankach z wszczepionym bioszkłem Sz2 wzrastała w kolejnych badanych seriach i we wszystkich seriach eksperymentu była istotnie wyższa wokół bioszkła w stosunku do kontrolnego szkła v-SiO_2. Na powierzchni granul bioszkła Sz2 obserwowano liczne komórki o morfologii osteoblastów, wykazujące wysoką aktywność enzymatyczną FA. Aktywność tego enzymu stwierdzano również na terenie substancji międzykomórkowej tkanek w okolicach implantu. W skrawkach tkankowych, w których wykonano reakcje na aktywność fosfatazy alkalicznej zwracała uwagę duża ilość pęcherzyków powietrza. Prawdopodobnie był to, produkowany przez osteoblasty, tlenek azotu (NO), który odgrywa ważną rolę w pierwszych fazach mineralizacji kości [Swaminathan, 2001]. Wysokie nasilenie reakcji wykrywającej aktywność alkalicznej fosfatazy w tkankach wokół implantu Sz2 i dużo niższe w tkankach

z wszczepionym szkłem v-SiO_2 świadczy o stymulującym wpływie bioszkła na różnicowanie się komórek w aktywne osteoblasty.

Paradoksalnie, na wzrost nowej kości wpływ mają również komórki kościogubne rozkładające kość, czyli osteoklasty. Osteoklasty charakteryzują się wysoką aktywnością enzymów hydrolitycznych, głównie kwaśnej fosfatazy. Wysoka aktywność FK charakteryzuje jednak również komórki wielojądrowe typu około ciała obcego, które często towarzyszą implantom i morfologicznie, w mikroskopie optycznym, są nie do odróżnienia od osteoklastów.

Wiarygodnym markerem dojrzałych osteoklastów w skrawkach tkankowych jest reakcja wykrywająca aktywność fosfatazy kwaśnej winianoopornej – TRAP [Chan i wsp., 2002]. Funkcja tego enzymu nie została jeszcze do końca rozpoznana. Wiadomo, że TRAP uczestniczy w hydrolizie wielu substratów, w tym nukleotydów, fosfoprotein i fosforowych związków arylowych oraz defosforylacji osteopontyny i sialoproteiny zaangażowanych w przyleganie komórek [Ek-Rylander, 1994]. Jest niezbędna dla prawidłowej mineralizacji chrząstki w procesie kostnienia i dla utrzymania spójności i przebudowy dojrzałego szkieletu [Hayman i wsp., 1996].

Większość osteoklastów barwiących się TRAP jest wielojądrowa i powstała przez fuzję komórek jednojądrowych, z których nieliczne również barwią się TRAP. Enzym ulega ekspresji dopiero w późnym etapie rozwoju komórki, co zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* [Takahashi i wsp., 1991], nie wykrywa więc komórek, które dopiero zaczęły się różnicować. Chociaż osteoklasty w warunkach *in vivo* są przede wszystkim komórkami wielojądrowymi, powstają z fuzji komórek jednojądrowych.

W przeprowadzonych badaniach największą intensywność reakcji na TRAP zaobserwowano w serii 21-dniowej wokół bioszkła Sz2, w dłuższych seriach aktywność TRAP wyraźnie spadała. Intensywność reakcji wykrywającej aktywność fosfatazy zasadowej rosła natomiast aż do dnia 42. Większa aktywność osteoblastów niż osteoklastów w serii 42-dniowej przemawia za przewagą procesów budowy tkanki kostnej nad jej resorpcją. Gould, w badaniach przeszczepów autologicznych u myszy, stwierdził największą aktywność FA i TRAP w serii 14-dniowej i obniżenie aktywności obu enzymów po sześciu tygodniach eksperymentu, z czego wnioskował, że komórki po wypełnieniu funkcji w procesach regeneracyjnych giną [Gould, 2000]. Różnice w długości okresów, na które przypadł szczyt aktywności FA i TRAP między naszymi wynikami a badaniami Goulda, wynikają prawdopodobnie z innego mechanizmu regeneracji, jaki zachodzi przy przeszczepach autologicznych oraz z zastosowania innego modelu zwierzęcego.

Wykryta w reakcjach histoenzymatycznych aktywność enzymów FK i EN, świadczy o stałej obecności komórek nacieku zapalnego. W początkowym okresie, w seriach 3, 7 i 21-dniowych uczestniczyły one w formowaniu tkanki ziarninowej, natomiast w późniejszych seriach były niezbędne do przebudowy tkanki ziarninowej, która stopniowo zastępowana była tkanką kostną. Nasilenie stanu zapalnego, a co za tym idzie, budowa i następnie przebudowa ziarniny, były intensywniejsze w tkankach z implantem Sz2.
Wysoka aktywność enzymów FK i EN, będących markerami komórek żernych – monocytów/ makrofagów, świadczy o obecności dużej liczby tych komórek. Monocyty/makrofagi mogą, pod wpływem cytokin wydzielanych przez inne komórki zapalne oraz produkowanego przez osteoblasty czynnika RANKL (ang. *Receptor Activator of Nuclear Factor NF-κB ligand*), przekształcić się w osteoklasty, lub uczestniczyć w ich różnicowaniu się z komórek progenitorowych [Udagawa, 2003].

Poza aktywnością markerowych enzymów związanych z komórkami stanu zapalnego i komórkami osteogennymi, prześledzono również aktywność enzymów związanych z procesami podstawowego metabolizmu. Wysoką aktywność badanych enzymów obserwowano w komórkach występujących zarówno na powierzchni wszczepu Sz2, jak i w skupiskach komórek w jego bliskim sąsiedztwie. We wszystkich badanych seriach aktywność tych enzymów była większa w tkankach otaczających implant bioszkła Sz2 w porównaniu do v-SiO_2, świadcząc o intensywnym przebiegu procesów gojenia się i regeneracji. Intensyfikację procesów regeneracji potwierdziła też wysoka aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej, enzymu dostarczającego nukleotydów niezbędnych do syntezy DNA w proliferujących komórkach.

Wysoka aktywność enzymów uczestniczących w podstawowych procesach metabolicznych (w tym oksydazy cytochromu c, enzymu o wysokiej wrażliwości na warunki środowiska) w komórkach bezpośrednio przylegających do biomateriału, świadczy o braku właściwości cytotoksycznych tego materiału. W tkankach wokół implantu nie stwierdzono występowania komórek o nieprawidłowej morfologii, co razem z wysoką aktywnością enzymatyczną tkanek potwierdza biokompatybilność użytego biomateriału [Logeart-Avramoglou i wsp., 2005].

We wcześniejszych badaniach porównawczych różnych typów bioszkła Sz2 i mrożonych liofilizatów kości allogenicznej wykazano, że zastosowanie bioszkła Sz2 do regeneracji kości jest co najmniej tak samo skuteczne, jak zastosowanie allograftu [Niedzielski, 2004], natomiast biomateriał jest łatwiejszy do pozyskania, przechowywania

i stosowania i, co najistotniejsze, nie stwarza niebezpieczeństwa przeniesienia czynników chorobotwórczych. Bioszkła Sz2 dzięki swym właściwościom bioaktywnym, nie tylko wypełniają miejsce ubytku, ale także stymulują wzrost nowej kości oraz naczyń krwionośnych, niezbędnych do zaopatrywania rozrastającej się tkanki w tlen i substancje odżywcze.

Wnioski

WNIOSKI

1.1. Badania w tkankach miękkich

Obecność biomateriałów nie wywołała wyraźnego obniżenia aktywności enzymów utleniających tj. G6PDH, NADHDH i OCC w włóknach mięśniowych szkieletowych i w tkance łącznej wokół wszczepów.

Stwierdzono wysoki stopień regeneracji włókien mięśniowych szkieletowych i tkanki łącznej w miejscu wszczepu.

Większą bioaktywnością w porównaniu do szkieł topionych RM i RMC wykazały się bioszkła żelowe Sz2 i A2.

Ze względu na wysoką zawartość CaO i szybką resorpcję materiału A2, materiał ten wydaje się stosowny do leczenia krótkotrwałego, małych ubytków. Do dalszych badań w zastosowaniu ortopedycznym wybrano bioszkło Sz2, jako materiał najlepiej rokujący w tym zastosowaniu..

1.2. Badania w tkankach twardych

Obserwacje morfologii wszczepu oraz aktywności wybranych enzymów utleniających i hydrolitycznych świadczą o tym, że badany biomateriał Sz2 wywołuje pożądane z punktu widzenia biologicznego reakcje tkankowe:

- jest dobrze tolerowany przez środowisko tkankowe,
- stanowi dobre podłoże o rozwiniętej powierzchni dla rosnących komórek
- zapewnia odpowiednie warunki dla proliferacji i różnicowania się komórek kościotwórczych,
- dostarcza składników niezbędnych do mineralizacji nowopowstającej tkanki.

Literatura

LITERATURA

1. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Podstawy biologii komórki. Wyd Nauk PWN, Warszawa 2005.

2. Agrawal CM. Reconstructing the Human Body Using Biomaterials. *JOM*. 1998, 50 (1): 31-35.

3. An YH, Woolf SK, Friedman RJ. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*. 2000, 21: 2635–52.

4. Anderson JM, Schoen FJ. In vivo assessment of tissue compatibility. In:. Ratner BD et al (ed.), Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004.

5. Anderson JM. The future of biomedical materials. *J Mater Sci: Mater Med*. 2006, 17: 1025–1028.

6. Apple DJ. Sir Harold Ridley. *Cataract & Refractive Surgery Today*. 2004, 47-52.

7. Aslan M, Simsek G, Dayi E: Guided bone regenerations (GBR) on healing bone defects: a histological study in rabbits. *J Contemp Dent Practice*. 2004, 6(2).

8. Babovic S, Johnson CH, Finical SJ**.** Free fibula donor-site morbidity: the Mayo experience with 100 consecutive harvests. *J Reconstr Microsurg.* 2000, 16: 107–10.

9. Bagiński S. Technika mikroskopowa. Praktyczny poradnik mikroskopowy. PWN, Warszawa 1965.

10. Ben-Nissan B: Natural bioceramics: from coral to bone and beyond. *Curr Op in Solid State and Mat Sci*. 2003, 7: 283-288.

11. Beutler B, Cerami A. Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr Rev*. 1988, 9 (1): 57-66.

12. Bieniek J, Oleszkiewicz L. Porowata ceramika korundowa w zastosowaniu klinicznym. *Chir Narz Ruchu Ortop Pol*. 1985, 5: 378-84.

13. Blakemore AH and Voorhees AB, Jr. The Use of Tubes Constructed from Vinyon "N" Cloth in Bridging Arterial Defects—Experimental and Clinical. *Ann Surg*. 1954, 140(3): 324–333.

14. Błażewicz M. Węgiel jako biomateriał. Badania nad biozgodnością włókien węglowych. Prace Komisji Ceramicznej PAN, *Ceramika* 63, 2001.

15. Boer H de: The history of bone grafts. *Clin Orthop.* 1988, 226: 292-298.

16. Bolder SB, Melenhorst J, Gardeniers JW, Slooff TJ, Veth RP, Schreurs BW. Cemented total hip arthroplasty with impacted morcellized bone-grafts to restore

17. acetabular bone defects in congenital hip dysplasia. *J Arthroplasty*. 2001, 16 (8 Suppl. 1): 164–9.

18. Bolder SB, Melenhorst J, Gardeniers JW, Slooff TJ, Veth RP, Schreurs BW. Cemented total hip arthroplasty with impacted morcellized bone-grafts to restore acetabular bone defects in congenital hip dysplasia. *J Arthroplasty*. 2001,16 (8 Suppl. 1): 164–9.

19. Brzezińska-Błaszczyk E, Zalewska A. Mastocyty i fibroblasty – obojętni sąsiedzi czy przyjaźni partnerzy? *Postępy Biol Kom*. 1997, 24 (2): 127-143.

20. Burstone MS. Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. Academic Press, New York, 1962.

21. Campbell AA. Bioceramics for implant coatings. *Mat Today*. 2003, 6 (11): 26-30.

22. Cao W, Hench L. Bioactive materials. *Ceramics International*. 1996, 22: 493-507.

23. Carano RAD, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 2003 8 (21): 980-9.

24. Carlisle EM. Silicon. In: Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements The nutritional essentiality of silicon. Ed. O'Dell BL, Sunde RA, CRC Press 1997.

25. Chan C, Thompson I, Robinson P i wsp.: Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. *Oral and Maxillofacial Surg*. 2002, 31, 73-77.

26. Chesmel K.D, Black J. Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel in vitro model system. *J Biomed Mater Res*. 1995, 29: 1089-1099.

27. Cichocki T, Litwin J, Mirecka J. Kompendium histologii. Wydawnictwo UJ, Kraków 1998.

28. Clark AE, Hench LL, Paschall HA. The influence of surface chemestry on implant interface histology: A theoretical basis for implant material selection. *J Biomed Mater Res.* 1976, 10: 161.

29. Coleman AI. A syllabus in the study of history of dentistry. USC COD, LA, 1970, 5-12.

30. Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF-alpha(-/-) and TNF-alpha(-/-)/LT-alpha(-/-) mice. *J Histochem Cytochem*. 2001, 49 (8): 989-1001.

31. Comuzzi L, Ooms EM, Jansen JA. Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats. *Clin Oral Impl Res*. 2002,13: 304–11.

32. Courtney JM. Artificial organs and biomaterials. *J Med Eng Technol*. 1993, 17: 188–190.

33. Cronin TD, Gerow FJ: Augmentation mammaplasty: A new “natural feel” prosthesis. Transactions of the Third International Congress of Plastic Surgery, Oct. 13-18, 1963, Amsterdam, The Netherlands, Excerpta Medica Foundation. 1963, pp 41-49.

34. Crubezy E, Murail P, Girard L, Bernadou JP. False teeth of the Roman world. *Nature*. 1998, v. 391: 29.

35. Damjanov I, McCue PA. Histopathology. A Colour Atlas and Textbook. Williams & Wilkins, 1996.

36. Davis JR. Handbook of materials for medical devices. ASM International, 2003.

37. Dedhar S, Mitchell MD, Pierschbacher MD. The osteoblast-like differentiated phenotype of a variant of MG-63 osteosarcoma cell line correlated with altered adhesive properties. *Connect Tissue Res*. 1989, 20 (1-4): 49-61.

38. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF : Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2001, 22: 87-96.

39. Doorn PF, Mirra JM, Campbell PA, Amstutz HC. Tissue reaction to metal on metal total hip prostheses. *Clin Orthop*. 1996, 329: 187–205.

40. Ek-Rylander B, Flores M, Wendal M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 1994, 269: 14853–14856

41. Fourney DR, Schomer DF, Nader R, Chlan-Fourney J, Suki D, Ahkar K, Rhines LD. Percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty for painful vertebral body fractures in cancer patients. *J Neurosurg*. 2003; 98 (1 Suppl.): 21–30.

42. Friedlander GE. Appropriate screening for prevention of infection transmission by musculoskeletal allografts. *Instr Course Lect*. 2000, 49: 615–9.

43. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, Levi-Schaffer F. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. *Clin Exp Allergy*. 2002, 32 (2): 237-46.

44. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*. 1995, 3:1-8.

45. Gentleman E, Polak JM: Historic and current strategies in bone tissue engineering: do we have hope in Hench? *J Mater Sci: Mater Med*. 2006, 17: 1029-1035.

46. Gitelis S, Cole BJ. The use of allografts in orthopaedic surgery. *Instr Course Lect*. 2002, 51: 07–20.

47. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, 105 (4): 651-63.

48. Gogolewski S. Biomateriały polimerowe. W: Błażewicz S, Stoch L (red.), Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Tom 4: Biomateriały. Akad. Oficyna Wyd. Exit, Warszawa 2003.

49. Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cells. *Nature*. 1962, 195: 297.

50. Goldner J. A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol*. 1938, 14: 237–43.

51. Gollera G, Demirkırana H, Oktarb FN, Demirkesena E. Processing and characterization of bioglass reinforcedhydroxyapatite composites. *Ceramics International*. 2003, 29: 721–724.

52. Gomez PF, and Morcuende JA. A Historical and Economic Perspective on Sir John Charnley, Chas F. Thackray Limited, and the Early Arthroplasty Industry. Iowa Orthop J. 2005, 25: 30–37.

53. Gould SE, Rhee JM, Tay BK-B i wsp.: Cellular contribution of bone graft to fusion. *J Orth Res.* 2000, 18(6): 920.

54. Green AM, Jansen JA, van der Waerden JPCM, Von Recum AF. Fibroblast response to microtextured silicone surfaces: Texture orientation into or out of the surface. *J Biomed Mater Res*. 1994, 28: 647-653.

55. Groth T, Falck P, Miethke RR. Cytotoxicity of Biomaterials - Basic Mechanisms and In Vitro Test Methods: A Review. *ATLA*. 1995, 23: 790-799.

56. Guillemin G, Patat J, Fournié J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. *J Biomed Mater Res*. 1987, 21: 557-567.

57. Hausmanowa - Petrusewicz I, Fidzińska E i wsp. Choroby mięśni. PWN Warszawa 1993.

58. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development.* 1996, 122: 3151–3162

59. Hench LL. Bioceramics: from concept to clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991, 74: 1487–510.

60. Hench L.L. Bioactive ceramics: Theory and clinical applications. Bioceramics, vol 7, Oxford 1994.

61. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res.* 1998, 15: 511–8.

62. Hench LL: The story of Bioglass. *J Mater Sci: Mater Med*. 2006, 17: 967-978.

63. Hench LL, Andersson O. Bioactive Glasses. In: An Introduction to Bioceramics. Ed. Hench LL and Wilson J. World Scientific, 1993.

64. Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A i wsp.: Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 contributes to the healing of critical-sized bone defects. *J Bone Miner Metab*. 2007, 25: 6-11.

65. Jakóbisiak M. (red.). Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000.

66. Jansen JA. Animal models for studying soft tissue biocompatibility of biomaterials. In: Animal models in orthopaedic research. Ed. Boca Raton, An YH, Friedman RJ. CRC Press, 1999.

67. Jarcho M.Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop*. 1981, 157: 259–78.

68. Jugdaohsingh R, Tucker KL, Qiao N, Cupples LA, Kiel DP Powel JJ. Dietary silicon intake is positively associated with bone mineral density in men and premenopausal women of the Framingham Offspring cohort. *J Bone Miner.Res*. 2004, 19 (2): 297-307.

69. Kao WJ, Lee D. In vivo modulation of host response and macrophage behavior by polymer networks grafted with fibronectin-derived biomimetic oligopeptides: the role of RGD and PHSRN domains. *Biomaterials*. 2001, 22: 2901 - 2909.

70. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. Eur Cell Mater. 2008, 15:100-14.

71. Keeting PE, Oursler MJ, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs BL. Zeolite A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone and Mineral Res*. 1992, 7: 1281-1289.

72. Keselowsky BG, Garcia AJ. Quantitative methods for analysis of integrin binding and focal adhesion formation on biomaterial surfaces. *Biomaterials*. 2005, 26(4): 413-8.

73. Kiernan JA. Histological and histochemical metods: Theory and practise. Pergamon Press, 1992.

74. Kim HM. Bioactive ceramics: challenges and perspectives. *J Ceram Soc Jpn*. 2001, 109: S49–57.

75. Kim HW, Song JH, Kim HE: Bioactive glass nanofiber-collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix. *J Biomed Mater Res*. 2006, 79A, 698-705.

76. Krishnaswamy G, Hall K, Youngberg G, Hossler F, Johnson D, Block WA, Huang SK, Kelley J, Chi DS. Regulation of eosinophil-active cytokine production from human cord blood-derived mast cells. *J Interferon Cytokine Res*. 2002, 22(3): 379– 88.

77. Kuokkanen H, Raty S, Korkola O, Niskanen R, Syrjanen KJ. Osteosynthesis and allogeneic bone grafting in complex osteoporotic fractures. *Orthopedics*. 2001, 24: 249–52.

78. Laczka-Osyczka A, Laczka M, Kasugai S, Ohya K. Behavior of bone marrow cells cultured on three different coatings of gel-derived bioactive glass-ceramics at early stages of cell differentiation. *J Biomed Mater Res*. 1998, 5; 42 (3): 433-42.

79. Laczka-Osyczka A, Turyna B, Dubin A, Laczka M. Comparison of biocompatibility of gel-derived bioactive ceramics in macrophage culture conditions. *Biomaterials*. 1997, 18 (18): 1243-1250.

80. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004, 428, 487-492.

81. Langer R. Perspectives: Drug delivery - drugs on target. *Science*. 2001, 293: 58-59.

82. Le Guéhennec L, Layrolle P, Daculsi G: A review of bioceramics and fibrin sealant. *European Cells and Materials*. 2004, 8: 1-11.

83. LeGeros EC and LeGeros RE. Dense hydroxyapatites. In: An Introduction to Bioceramics. Ed. Hench LL and Wilson J. World Scientific, 1993.

84. Lieberman JR, Friedlaender GE. Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications. Springer, 2005.

85. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H: Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. 2005, 9 (1): 72-84.

86. Lossdörfer S, Schwartz Z, Lohmann CH: Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. *Biomaterials*. 2004, 25: 2547-2555.

87. Lotze MT. In vivo veritas. *Clin Immunol*. 1999, 93 (1): 1–4.

88. Łączka M. Ceramic Materials In Medicine. *Inż Biomat*. 1998, 4: 3-9.

89. Łączka M. Materiały bioaktywne pochodzenia żelowego. W: Błażewicz S, Stoch L (red.), Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Tom 4: Biomateriały. Akad. Oficyna Wyd. Exit, Warszawa 2003.

90. Łączka M., Cholewa K. The surface phenomena in gel-derived glasses and glass-ceramics materials of the CaO - P_2O_5 - SiO_2 system. *Chem. Papers*. 1997, 51(6a): 348-356.

91. Łączka M., Cholewa-Kowalska K., Zamorska L., Sindut R., Czajkowska B. Bioszkła jako wypełnienia ubytków kostnych. *Ceramika/Ceramics*. 2003, 80, 217-222.

92. Maddox E, Zhan M, Mundy GR, Drohan WN, Burgess WH. Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng.* 2000, 6: 441–8.

93. Majno G, Joris I..Inflammation – The Actors and Their Language. In: Cells, Tissues, and Disease, part II: Inflammation. Blackwell Science Inc, Cambridge, USA 1996: 321-363.

94. Malloy KM, Hilibrand AS. Autograft versus allograft in degenerative cervical disease. *Clin Orthop*. 2002, 394: 27–38.

95. Marciniak J, Paszenda Z. Odporność korozyjna i biotolerancja implantów z biomateriałów metalicznych stosowanych w chirurgii kostnej. Materiały 3 Sympozjum „DERO" pt. „System DERO: Rozwój technik operacyjnych leczenia kręgosłupa", s. 11, Nałęczów, 10 VI 1999.

96. Marciniak J. Biomateriały. Wyd Politechniki Śląskiej, Gliwice 2002.

97. Martin GJ Jr, Boden SD, Titus L, Scarborough NL. New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine*. 1999, 24(7): 637-45.

98. Maśliński S, Ryżewski J. Patofizjologia. PZWL Warszawa 1998.

99. Melo Luiz GN: Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. *Clin Oral Impl Res.* 2005, 16: 683-691.

100. Menaszek E, Niedzielski K, Demczuk B, Cholewa-Kowalska K, Łączka M. The repair of bone defects with bioglass implants. A histochemical study. *Folia Morphologica*. 2007, 66 (3): 239.

101. Menaszek E, Niedzielski K, Koktysz R, Bandurka W, Łączka M, Cholewa-Kowalska K, Synder M. Histoenzymatyczne i histologiczne badania reakcji tkankowych wokół implantu bioceramicznego Sz2. *Kwartalnik Ortop*. 2005, 3: 222-226.

102. Menaszek E, Ścisłowska-Czarnecka A, Cholewa-Kowalska K, Łączka M. Biological responses in MG-63 osteoblast-like cell line cultured on sol-gel derived bioglass layers.13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry. "Imaging of Cell Dynamics" Gdansk, Poland, August 23 - 27 2008.

103. Menaszek E, Zamorska L, Żołnierek M, Łączka M, Chomyszyn-Gajewska M. The kinetics of tissue response to bioglass and glass-ceramic implants in the rat skeletal muscle. Mat.10th Int. Symp. Pol. Net. Mol. Cell. Biol. UNESCO/PAN "Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism", Kraków, 5-6VI 2001, 235-236.

104. Mróz W, Jedyński M, Burdyńska S, Prokopiuk A, Ślósarczyk A, Łączka M, Cholewa-Kowalska K, Menaszek E, Ścisłowska-Czarnecka A, Niedzielska A. Porównanie warstw hydroksyapatytu i hydroksyapatytu zmieszanego z bioszkłem, osadzanych metodą PLD. *Inż Biomat. 2008*, 77-80: 96-98.

105. Murray RK, Granner D., Mayes PA, Rodwell VW. Biochemia Harpera. PZWL Warszawa 1998.

106. Nagase M, Chen RB, Araya Y, Nakajima T. Evaluation of a bone substitute prepared from alpha-tricalcium phosphate and an acid polysaccharide solution. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991, 49: 1305–9.

107. Niedzielski K: Właściwości biologiczne i przydatność bioceramiki nowej generacji Sz2 w zabiegach rekonstrukcyjnych kości. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź 2004.

108. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. Vet Dermatol. 2001, 12(6): 303-13.

109. Ooms EM, Egglezos EA, Wolke JGC, Jansen JA. Soft-tissue response to injectable calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2003, 24: 749-757.

110. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E i wsp. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. Clin Orth Rel Res. 1997, 334: 316-325.

111. Ostrowski K. Histologia. PZWL Warszawa, 1995.

112. Pagani F, Francucci CM, Moro L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest*. 2005, 28 (10 Suppl): 8-13.

113. Paprosky WG, Martin EL. Structural acetabular allograft in revision total hip arthroplasty. *Am J Orthop*. 2002, 31: 481–4.

114. Pearse EAG. Histochemistry Theoretical and Applied. Churchill Livingstone Longman Group, London 1991.

115. Peltier LF. Fractures: A History and Iconography of Their Treatment. Norman Publishing, 1990.

116. Phipps S, Ying S, Wangoo A, Ong YE, Levi-Schaffer F, Kay AB. The relationship between allergen-induced tissue eosinophilia and markers of repair and remodeling in human atopic skin. *J Immunol. 2002*, 169 (8): 4604-12.

117. Piatelli M, Favero G, Scarano A, Orsini G, Piatelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic longterm report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Impl*. 1999, 14: 835-840.

118. Piattelli A, Scarano A, Piattelli M: Detection of alkaline and acid phosphatases around titanium implants: a light microscopical and histochemical study in rabbits. *Biomaterials*. 1995, 16: 1333-1338.

119. Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA. Boneformation and implant degradation of corraline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995, 53(8): 915-23.

120. Ptak W, Ptak M. Podstawy immunologii. Wyd UJ, Kraków 1999.

121. R.A.Collins, M.D.Grounds. The role of tumor necrosis factor-alfa (TNF-a) in skeletal muscle regeneration: studies in TNF-a(-/-) and TNF-a(-/-)/LT-a(-/-) Mice. *J.Histochem.Cytochem*. 2001, 49: 989-1001.

122. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen J F, Lemons J E. Biomaterials Science - A Multidisciplinary Endavour. In:. Ratner BD et al (ed.), Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004.

123. Ratner BD. A History of Biomaterials. In:. Ratner BD et al (ed.), Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2004.

124. Ratner BD. New ideas in biomaterials science - a path to engineered biomaterials. *J Biomed Mat Res.* 1993, 27: 837 – 843.

125. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunologia. PZWL Warszawa 2000.

126. Saalfeld U, Meenen NM, Jüres TT, Saalfeld H. Solubility behaviour of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value. *Biomaterials*. 1994, 15 (11): 905-8.

127. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2000, 30, suppl 1: 22-7.

128. Sanan A, Haines S J. Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. *Neurosurgery*. 1997, 40: 588–602.

129. Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R: Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. *J Oral Rehabil*. 1991, 18(5): 439-452.

130. Schilephake H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002, 31: 469–84.

131. Schweiberer L, Stutzle H, Mandelkow HK. Bone transplantation – historical review. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1989,109:1-8.

132. Sindut R. Bioszkła nowej generacji: wpływ parametrów materiałowych na bioaktywność. Praca doktorska. Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica, Kraków, 2006.

133. Slavkin HC. Biomimicry, dental implants and clinical trials. *JADA*. 1998, 129: 226-230.

134. Slooff TJ, Buma P, Schreurs BW, Schimmel JW, Huiskes R, Gardeniers J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clin Orthop*. 1996, 324:108–15.

135. Stryer L. Biochemia. Wyd Naukowe PWN, Warszawa 2000.

136. Sugawara A, Nishiyama M, Kusama K, Moro I, Nishimura S, Kudo I, Chow LC, Takagi S. Histopathological reactions of calcium phosphate cement. *Dent Mater* J. 1992, 11:11–6.

137. Swaminathan R: Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chemica Acta*. 2001, 313: 95-105.

138. Ślósarczyk A. Bioceramika hydroksyapatytowa. Wyd. Polskie Towarzystwo Ceramiczne, Kraków 1997.

139. Takahashi N, Udagawa N, Akatsu T, Tanaka H, Shionome M, Suda T. Role of colony-stimulating factors in osteoclast development. *J Bone Miner Res*. 1991, 6(9): 977-85.

140. Tang L, Jennings TA, Eaton JW. Mast cells mediate acute inflammatory response to implanted biomaterials. *Med Sci*. 1998, 95: 8841–8846.

141. Therin M, Christel P, Meunier A. Analysis of the general features of the soft tissue response to some metals and ceramics using quantitative histomorphometry. *J Biomed Mat Res*. 1994, 28: 1267-1276.

142. Tidball JG. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1995, 27 (7): 1022-32.

143. Todd R, Donoff BR, Chiang T, et al. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wound. *Am J Pathol*. 1991, 138 (6): 1307-1313.

144. Tomford WW, Mankin HJ: Bone banking. Update on methods and materials. *Othop Clin North Am.* 1999, 30: 565-570.

145. Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci*. 1990, 587: 325-31.

146. Trautmann A, Krohne G, Brocker EB, Klein CE. Human mast cells augument fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *J Immunol*. 1998, 160 (10): 5053-7.

147. Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass((R)) conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials*. 2009 Mar 30. [Epub ahead of print]

148. Tworzydło M, Laczka M, Rajwa B i wsp.: Evaluation of biocompatibility of apatite-wollastonite ceramics in fibroblast cultures. Folia Histochem Cytobiol. 2000, 38(3): 133-141.

149. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. J Bone Miner Metab. 2003, 21:337–343.

150. Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani J, Hammerle. Histological evaluation of Bio-Oss® in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Impl Res*. 1998, 9: 59-64.

151. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF: The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004, 25: 2941-2948.

152. van der Meulen J, Koerten HK. Inflammatory response and degradation of three types of calcium phosphate ceramic in a nonosseous environment. J Biomed Mater Res. 1994, 28:1455–63.

153. Vanderwerker EE. A Brief Review of the History of Amputations and Prostheses. *ICIB* 1976, 15 (5): 15-16.

154. Vogel M, Voigt C, Gross UM, Müller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials*. 2001, 22: 357-362.

155. Vrouwenvelder WC, Groot CG, de Groot K. Histological and biochemical evaluation of osteoblasts cultured on bioactive glass, hydroxylapatite, titanium alloy, and stainless steel. *J Biomed Mater Res*. 1993, 27 (4): 465-475.

156. Werkmeister JA, Tebb TA, White JF, Ramshaw JAM. Collagenous tissue formation in association with medical implants. *Curr Opinion in Solid State and Mat Sci.* 2001, 5: 185 –191.

157. Wheeler DL, William F. Enneking. Allograft Bone Decreases in Strength In Vivo over Time. *Clin Orthop and Related Res*. 2005, 435: 36–42.

158. Wiliams DF. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery. *Sadhana*, 2003, vol. 28, Parts 3 & 4: 563–574.

159. Williams, DF. Definitions in biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Vol. 4. Chester, England, March 3-5 1986. New York: Elsevier, 1987.

160. Wilson J, Clark AE, Hall M et al.: Tissue response to Bioglass® endosseous ridge maintenance implants. *J Oral Implantology.* 1993, 19(4): 295-302.

161. Wolff J. The Law of Bone Remodeling. Berlin Heidelberg New York: Springer, 1986 (translation of the German 1892 edition).

162. Wood K, Azarin S, Arap W, Pasqualini R, Langer R, and Hammond P. Tumor-targeting gene delivery using molecularly engineering hybrid polymers functionalized with a tumor-homing peptide. *Bioconjugate Chemistry*. 2008, 19: 403-405.

163. Yoshikawa T: Bone and soft tissue regeneration by bone marrow mesenchymal cells. *Mat Sci and Eng C*. 2001, 17: 19-26.

164. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery DK, Hench LL, Polak JM. Jonic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like

Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, 24; 276 (2): 461-5.

165. Yuan HP, Yang ZJ, Li Y, Zhang XD, De Bruijn JD, De Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 1998, 9: 723–6.

166. Zangrilli JG. Regulation of Eosinophil Viability by Cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2002, 26: 388-390.

167. Zawistowski S. Technika histologiczna, histologia i podstawy histopatologii. PZWL, Warszawa 1986.

Słownik

SŁOWNIK

Bioadhezja - przyleganie komórek do powierzchni biomateriału.

Bioaktywność - zdolność biomateriału do tworzenia bezpośrednich połączeń z tkanką, bez tworzenia warstwy pośredniej zbudowanej z tkanki zmodyfikowanej (tkanki łącznej włóknistej).

Bioceramika - materiał ceramiczny stosowany jako biomateriał.

Biodegradacja - stopniowy rozkład materiału w wyniku działania środowiska biologicznego.

Biokompatybilność (biozgodność) - a) zdolność materiału do spełniania zadania, z akceptowalną odpowiedzią gospodarza, w określonym zastosowaniu b) spełnianie funkcji biologicznych w określonym zastosowaniu, w sposób zgodny z przeznaczeniem.

Biomateriał - a) materiał syntetyczny lub pochodzenia naturalnego przeznaczony do współistnienia z biologicznymi systemami: leczenia, diagnozowania, poprawiania lub zastąpienia częściowego lub całkowitego tkanki, narządu, lub spełniania ich funkcji w organizmie, b) materiał stosowany w wyrobach, urządzeniach lub też przyrządach medycznych, przeznaczony do oddziaływania z biologicznymi systemami.

Biomateriał inertny (obojętny) – materiał, który w kontakcie z tkanką wywołuje małą lub znikomą odpowiedź biologiczną.

Biomateriał aktywny - przeznaczony do wywoływania i/lub modulowania specyficznej odpowiedzi biologicznej.

Biomateriał naturalny - materiał, który otrzymany został z naturalnych źródeł, bez jego dalszego przetwarzania.

Biopierwiastki - pierwiastki niezbędne do budowy i funkcjonowania organizmów żywych.

Bioresorbowalność - zdolność biomateriału do rozkładu pod wpływem czynników środowiska biologicznego do nieszkodliwych produktów, będących naturalnymi produktami przemiany materii (np. kwas mlekowy w cyklu Krebsa).

Biotolerancja - zgodność biologiczna biomateriału (materiał wprowadzony do organizmu nie wywołuje ostrych lub chronicznych reakcji, ani stanu zapalnego otaczających tkanek).

Cytokiny - grupa różnorodnych cząsteczek chemicznych produkowanych przez komórki, przenoszących sygnały między komórkami.

Cytotoksyczność – oddziaływania prowadzące do uszkodzenia i śmierci komórki (przez inne komórki, białka dopełniacza, przeciwciała, lub inne czynniki).

Cytotoksyczny - mający szkodliwy (prowadzący do śmierci) wpływ na metabolizm komórki.

Fagocytoza - proces wchłaniania większych cząsteczek przez komórkę.

Fagocyt sfrustrowany – fagocyt uwalniający na zewnątrz enzymy lizosomalne w przypadku, gdy cząsteczka jest zbyt duża i nie może zostać sfagocytowana.

Fibroblasty - najbardziej powszechne i liczne komórki tkanki łącznej. Ich zadaniem jest ciągłe, powolne przetwarzanie składników substancji międzykomórkowej. Głównym produktem fibroblastów jest kolagen.

Fibrocyty - powstają z fibroblastów przechodzących w stan spoczynku, przy czym proces ten jest odwracalny.

Implant (wszczep) - urządzenie medyczne zastępujące lub uzupełniające tymczasowo brak tkanki, wykonane z jednego lub więcej biomateriałów, umiejscowione całkowicie lub częściowo poniżej powierzchni nabłonkowej.

Implant ortopedyczny – stosowany w leczeniu układu szkieletowego.

Implant przezskórny - urządzenie, które po umieszczeniu w organizmie przechodzi przez skórę i jednocześnie ma kontakt z otoczeniem zewnętrznym.

Implantacja - umieszczenie urządzenia lub materiału w organizmie, zgodnie z zasadami medycznego lub chirurgicznego postępowania, w taki sposób, że następuje przerwanie jednego lub więcej warstw nabłonkowych, a urządzenie, materiał lub jego składniki pozostają w miejscu po zakończeniu całej procedury operacyjnej.

Integracja - oddziaływanie dotyczące grupy materiałów bioaktywnych, dla których obserwuje się tworzenie wiązania chemicznego lub bezpośredniego przylegania do tkanek.

Inżynieria biomateriałów - zastosowanie zasad i praw nauki o biomateriałach do rozwiązywania praktycznych problemów związanych ze zdrowiem człowieka.

Inżynieria tkankowa - interdyscyplinarna dziedzina wykorzystująca podstawy i metody inżynierii, biotechnologii oraz medycyny klinicznej, w celu regeneracji uszkodzonych lub usuniętych tkanek i narządów wewnętrznych oraz wytworzenia nowych tkanek.

Komórki olbrzymie około ciała obcego - wielojądrowe komórki olbrzymie powstające z monocytów/makrofagów ulegających fuzji w warunkach przewlekłej stymulacji cytokinami w obecności ciała obcego.

Kościotwórczy (osteogeniczny) - właściwość biomateriału, która stymuluje wzrost kości w miejscu, w którym znajduje się implant.

kościotworzenie - proces tworzenia nowej kości zachodzący na podłożu tkanki łącznej właściwej (mezenchymatycznej) lub chrząstki.

Leukocyty - komórki stanowiące istotną część systemu obrony organizmu przed drobnoustrojami. Funkcje obronne spełniają głównie w tkankach, na zewnątrz naczyń

krwionośnych, używając krwi jako środka transportu. Wykazują zdolność ruchu ameboidalnego, umożliwiającego migrację z i do systemu krążenia oraz poruszanie się na terenie tkanek.

Materiał bioaktywny - biomateriał przeznaczony do wywoływania lub modulowania (regulowania) specyficznej aktywności biologicznej.

Materiał biozgodny - wywołujący akceptowalną odpowiedź gospodarza w określonym zastosowaniu.

Odczyn zapalny ostry (faza ostra)– początkowa reakcja tkanek na uszkodzenie i/lub infekcję. Następuje zmiana przepuszczalności naczyń krwionośnych, napływ leukocytów. Głównymi komórkami są neutrofile i mastocyty. Gwałtowny, szybko mija (w obecności ciała obcego do ok. 3-4 tygodni).

Odczyn zapalny chroniczny (faza chroniczna) - podział na ostry i chroniczny jest umowny. Przewlekły następuje zwykle po ostrym, charakterystycznymi komórkami są makrofagi. limfocyty, plazmocyty. Następuje proliferacja fibroblastów.

Odpowiedź zapalna (zapalenie, stan zapalny) - odpowiedź na uszkodzenie ukrwionej tkanki. Celem jest mobilizacja i dostarczenie środków obronnych do miejsca uszkodzenia. Trwa tak długo, jak jest potrzebne do wyeliminowania przyczyny i naprawienia szkody.

Osteoblasty - komórki tworzące kość (kościotwórcze), występujące w miejscach, gdzie odbywa się. wzrost lub przebudowa tkanki kostnej; wytwarzają część organiczną macierzy kostnej, która następnie ulega mineralizacji.

Osteocyty - ostateczna forma komórek dojrzałej kości, powstają z przemiany osteoblastów w trakcie mineralizacji macierzy kostnej.

Osteoklasty - komórki resorbujące kość (kościogubne), uczestniczące w fizjologicznym procesie przebudowy tkanki kostnej. Przy nadmiernej przewadze aktywności osteoklastów względem osteoblastów dochodzi do patologicznego procesu utraty masy kostnej.

Osteokonduktywny - właściwość biomateriału znajdującego się w kontakcie z odtwarzaną kością, polegająca na wspomaganiu tego procesu.

Osteointegracja - stabilizacja kliniczna (wytworzenie trwałego połączenia) implantu zakotwiczonego w kości.

Naciek zapalny – miejscowy odczyn zapalny przejawiający się nagromadzeniem płynu tkankowego i leukocytów.

Proteza - urządzenie, które zastępuje kończynę, narząd lub tkankę ciała.

Przeszczep (graft, transplant) - fragment żywej tkanki lub zbiór żywych komórek przeniesiony od dawcy do biorcy w celu rekonstrukcji tkanek, w którym po wprowadzeniu do

organizmu następuje przywrócenie krążenia; a) przeszczep autogeniczny (autograft) - przeszczep z tkanek biorcy (dawca i biorca są tą samą osobą); b) przeszczep allogeniczny (allograft, alograft) - przeszczep pobrany od innego osobnika tego samego gatunku; c) przeszczep ksenogeniczny (ksenograft) - przeszczep pobrany od osobnika innego gatunku niż biorca.

RANKL - czynnik aktywujący proces tworzenia dojrzałych osteoklastów. Należy do rodziny białek czynników martwicy nowotworów, produkowany jest przez dojrzałe osteoblasty i ich prekursory oraz limfocyty T. Działa poprzez receptor RANK, znajdujący się na powierzchni komórek docelowych.

Reakcja ciała obcego (około ciała obcego) - zmiana w typowym (normalnym) zachowaniu się tkanki, spowodowana obecnością ciała obcego.

Resorbowalny - zdolność biomateriału do zanikania w środowisku biologicznym drogą rozpuszczania się lub trawienia.

Środowisko biologiczne - warunki występujące w organizmie żywym.

Torebka (otoczka) łącznotkankowa - tkanka powstała w wyniku lokalnej odpowiedzi, otaczająca implant, izolująca go od pozostałych tkanek. Składa się głównie z kolagenu i fibrocytów.

Zapalenie (stan zapalny) - miejscowa, fizjologiczna reakcja obronna tkanki na inwazję czynnika zakaźnego lub na uszkodzenie. Towarzyszy mu zaczerwienienie, podwyższona temperatura, obrzęk, ból i upośledzenie funkcji.

Ziarnina - nowa tkanka łączna powstająca w miejscu uszkodzenia tkanki lub chronicznego stanu zapalnego. Bogata w komórki (fibroblasty i leukocyty), bogato unaczyniona, z niewielką ilością kolagenu.

Definicje opracowano na podstawie:

1. *Encyklopedia Biologiczna. Wyd. OPRES, Kraków 1998.*
2. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 29th Edition. Ed.WB Saunders 2000.*
3. *Błażewicz S, Stoch L (red.), Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Tom 4: Biomateriały. Akad. Oficyna Wyd. Exit, Warszawa 2003.*