

BOGUSŁAWA ŻYWICKA¹, EWA KARUGA¹, MAŁGORZATA RUTKOWSKA-GORCZYCA²,
JERZY GARCAREK³, ZBIGNIEW JAEGERMANN⁴, SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI⁴

Badanie wpływu mikrostruktury wszczepów na osnowie TiO₂ na proces formowania się tkanki kostnej

Examination of influence of microstructure of grafts on TiO₂ base on the process of bone tissue forming

¹ Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Polska

² Instytut Materiałoznawstwa i Mechaniki Technicznej, Zakład Materiałoznawstwa Politechniki Wrocławskiej, Polska

³ Zakład Radiologii Ogólnej, Zabiegowej i Neuroradiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Polska

⁴ Zakład Bioceramiki Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie, Polska

Streszczenie

Cel pracy. Przedmiotem badań była ocena wpływu wprowadzonej modyfikacji struktury w porowatych wszczepach ceramicznych na osnowie TiO₂ na przrastanie tkanką kostną, w badaniach z zastosowaniem mikroskopii skaningowej i RTG.

Materiał i metoda. Przygotowano nowe materiały ceramiczne oparte na TiO₂, które cechowały się wysokimi wartościami wytrzymałości mechanicznej, dużym stopniem spieczenia oraz biogodnością w warunkach *in vitro*. Właściwości te czynią z nich godne zainteresowania potencjalne materiały kościozastępcze. Z ceramiki opartej na TiO₂ wytworzono dwa rodzaje wszczepów: o budowie zwartej i o strukturze porowatej. Wprowadzona modyfikacja struktury – makroporowatość – miała na celu nadanie wszczepom właściwości osteokondukcyjnych i wywołanie procesów sprzyjających formowaniu się tkanki kostnej. W badaniach miejscowej reakcji tkanki kostnej po implantacji wytworzonych wszczepów porowatych i stopnia ich osteointegracji, istotnym zagadnieniem jest ocena zasiedlenia wewnętrznych przestrzeni przez tkanki podporowe. Próbkami badanych materiałów zwartych i porowatych w formie walców wszczepiano w kości udowe królików na okres do 6 miesięcy. Powierzchnie wszczepów i stopień ich zasiedlenia tkankami podporowymi, oceniano w przekrojach implantów metodami mikroskopii świetlnej i skaningowej i potwierdzano w badaniach RTG.

Wyniki. Analiza uzyskanych danych wykazała, że powierzchnia ceramiki zwartej pokryta była głównie wzrastającymi z czasem obserwacji ilościami substancji międzykomórkowej i blaszek kostnych. Makroporowata struktura ceramiki porowatej na osnowie TiO₂ umożliwiła zasiedlenie wewnętrznych przestrzeni wszczepu komórkami tkanek podporowych, częściowo w 1 miesiącu, intensywniej w 3 i nie została zakończona w 6 miesiącu po implantacji.

Wnioski. Porowate wszczepy na bazie TiO₂ w postaci pianki ceramicznej wykazywały właściwości osteokondukcyjne, choć proces kolonizacji w 6 miesiącu obserwacji nie został zakończony, a kondycja komórek wewnątrz implantu była osłabiona (Polim. Med. 2013, 43, 2, 81–91).

Słowa kluczowe: ceramika porowata TiO₂, osteointegracja, osteokondukcja, biomateriały

Summary

Aim of the study. Evaluation of the influence of the introduced structure modification in porous ceramic grafts on TiO₂ base on overgrowing with bone tissue, in examinations with use of scanning microscopy and X-rays was the subject of the examinations.

Material and method. New ceramic materials based on TiO₂ with high values of mechanical resistance, large sintering degree and biocompatibility in *in vitro* conditions were prepared. Those properties cause that they are worth interest as potential osteosubstitutive materials. Two kinds of grafts were created from ceramics based on TiO₂: with compact and porous structure. The introduced structure modification – macroporosity – had the purpose to give osteoconductive properties to the grafts, to evoke processes favorable for bone tissue forming. In examinations of the local reaction of bone tissue after implantation of the formed porous grafts, degree of their osteointegration, the essential issue is the evaluation of the settling of the inner spaces with supporting tissues. Samples of the tested compact and porous materials in the form of cylinders were implanted in femoral bones of rabbits for a period till 6 months. The surfaces of grafts and the degree of their settling with

supporting tissues were evaluated in cross-sections of the implants with light and scanning microscopic methods and they were confirmed in X-ray tests.

Results. Analysis of the obtained data showed that, the surface of solid ceramic on TiO₂ base was covered mainly with increasing with a time of observation quantities of extracellular substance and lamellas of bone. The macroporous structure of porous ceramic on TiO₂ base enabled settling of the inner spaces of graft with supporting tissue cells, partly in the 1st month, more intensively in the 3rd and it was not completed in the 6th month after implantation.

Conclusions. Porous grafts in the form of ceramic foam on TiO₂ base showed osteoconductive properties, though process of colonization after 6th month observation was not completed and the condition of the cells inside of the implant was reduced. (*Polim. Med.* 2013, 43, 2, 81–91).

Key words: porous ceramics TiO₂, osteointegration, osteoconduction, biomaterials

Wprowadzenie

Coraz wyższe oczekiwania pacjentów i lekarzy wobec możliwości regeneracji tkanki kostnej i chrzęstnej, skutkują ciągłymi poszukiwaniami nowych materiałów implantacyjnych do zastosowań w chirurgii kostnej. W Zakładzie Bioceramiki Instytutu Ceramiki i Materiałów Budowlanych w Warszawie opracowano technologie otrzymywania nowych materiałów ceramicznych, opartych na tlenku tytanu – TiO₂. Zgodnie z wynikami badań wytwórców nowych materiałów, cechują się one dobrymi właściwościami mechanicznymi i wysokim stopniem spieczenia. Wstępne badania *in vitro* wykonane na hodowlach komórkowych wykazały, że wytworzone materiały były dobrze tolerowane przez osteoblasty i stanowią obiecujący materiał do zastosowań medycznych [1].

Biozgodne właściwości tlenku tytanu zostały potwierdzone licznymi badaniami i są przedmiotem prac aplikacyjnych. Wg Majewskiego i wsp.: „Integracja kostna wszczepów tytanowych jest możliwa dlatego, że tytan wprowadzony do struktur kostnych żywego organizmu, nie podlega typowym dla innych metali zjawiskom korozji. Na jego powierzchni powstaje warstwa z tlenków tytanu, charakteryzująca się wysokim stopniem biozgodności, a na styku kość-implant wytwarzają się biocząsteczki, będące konglomeratem metalu i żywych składników komórkowych tkanki kostnej, tworzące rodzaj spoiwa łączącego kość z powierzchnią implantu, bez pośrednictwa tkanki łącznej” [2].

Z ceramiki opartej na TiO₂ wytworzono dwa rodzaje wszczepów: (a) o budowie zwartej i (b) o strukturze porowatej. Wytworzenie struktury porowatej o charakterze makroporowatej pianki ceramicznej, miało na celu uzyskanie wszczepu o właściwościach osteokondukcyjnych, umożliwiającego formowanie się tkanki kostnej o prawidłowej budowie anatomicznej wewnątrz struktury porowatej wszczepu. W ocenie miejscowej reakcji tkanki kostnej po implantacji litych potencjalnych materiałów kościostępczych, ważny jest udział procesów zapalnych, reparacyjnych i regeneracyjnych zarówno w otaczających tkankach, jak i na granicy faz implant-tkanka [3].

W badaniach procesu wgajania się porowatych wszczepów, ważna jest także ocena wpływu struktury

na proces migracji komórek tkanek podporowych, substancji międzykomórkowej i naczyń krwionośnych do przestrzeni wewnętrznych implantu. Obserwację właściwości osteokondukcyjnych wszczepu, stopnia i sposobu zasiedlenia tkankami podporowymi na granicy faz implant-tkanka, umożliwiają techniki mikroskopowe w tym badania powierzchni przekrojów w elektronowej mikroskopii skaningowej i w obrazowaniu RTG.

Badania wykonano za zgodą I LKE we Wrocławiu nr 56/2009 z dnia 21 X 2009.

Cel badań

Celem badań było określenie wpływu porowatej struktury wszczepów opartych na TiO₂ na stopień przrastania i charakter tkanki kostnej, na podstawie obserwacji metodami mikroskopii świetlnej i skaningowej.

Materiały

Do badań zostały przygotowane dwa rodzaje próbek badawczych (wszczepów ceramicznych) na osnowie TiO₂:

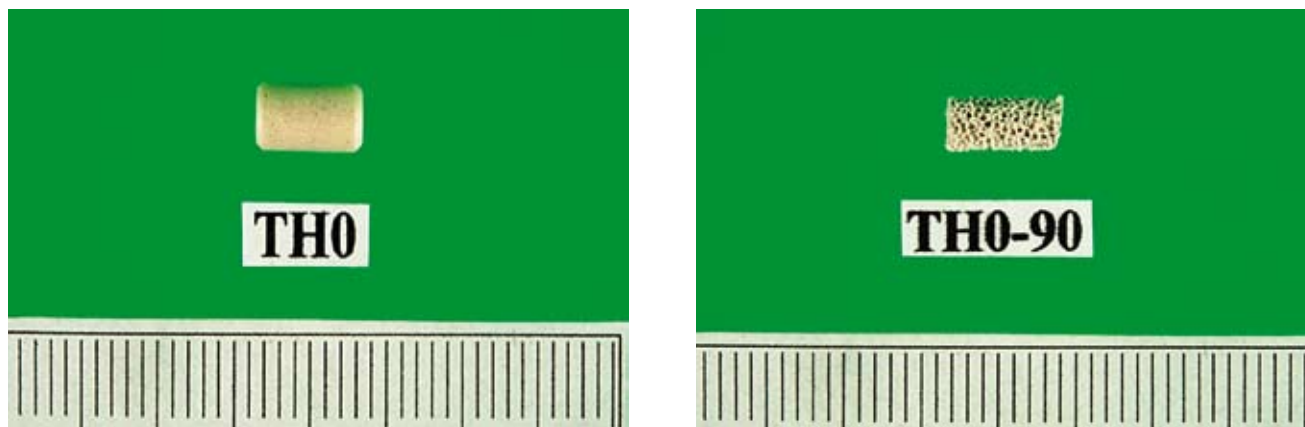
1. Implanty zwarte o symbolu „TH0” (100% TiO₂)
2. Implanty makroporowate o symbolu „TH0–90” (100% TiO₂), formowane metodą odwzorowania matrycy organicznej w postaci pianki poliuretanowej o wielkości oczek 90 ppi

Wszystkie wszczepy wykonano w kształcie cylindrów o średnicy 3 mm i długości 6 mm i sterylizowano radiacyjnie dawką 25 kGy (ryc. 1 a, b).

Metodyka badań

Badania implantacyjne

Badania implantacyjne wykonano u 9 królików rasy nowozelandzkiej białej, wszczepiając na okres 1, 3 i 6 miesięcy do krętarzy kości udowych próbki badanej ceramiki porowatej po stronie prawej i lewej po stronie przeciwnej.



Ryc 1. Próbkki badawcze (implanty ceramiczne) na osnowie TiO_2 o budowie litej (po lewej) i porowatej (po prawej)

Fig. 1. Sample of ceramic implant on the basis TiO_2 build as a solid (left) and porous (right)

Na dobę przed planowanym zabiegiem, zwierzętom usuwano mechanicznie okrywą włosową okolic obu stawów biodrowych. Operacje wszczepienia wykonywano w znieczuleniu ogólnym, z zachowaniem zasad aseptyki chirurgicznej. Po uzyskaniu pełnego snu podstawowego, okolica udowa ostrzykiwana była dodatkowo 1% Lignokainą. Pole operacyjne odkażano preparatem Skinset-color (producent Ecolab), następnie wykonywano cięcie skórne na wysokości stawu biodrowego o długości ok. 5 cm.

Po zlokalizowaniu krętarzy i odreparowaniu okostnej nawiercano dwa otwory, w których deponowano próbki ceramiki. Mięśnie i tkanki podskórne zamykano warstwowo szwami pojedynczymi z materiału wchłanianego PGA II o średnicy 3-0 (producent YAVO, Polska), ranę skórną zaopatrzono szwami pojedynczymi Monosorb PDO o średnicy 2-0 (producent YAVO, Polska). Po zabiegu skórę odkażano preparatem Skinsept (producent Ecolab, Polska).

W zaplanowanych terminach badawczych, tj. po 1, 3 i 6 miesiącach, po wykonaniu badań sekcyjnych z utrwalonych fragmentów tkanek (w 4% formalinie) pobierano wszczepione implanty i poddawano obróbce prowadzącej do uzyskania ultra suchego materiału, w celu obserwacji zmian w skaningowej mikroskopii elektronowej.

Badania mikroskopowe

Aby ocenić stopień przerastania tkanką kostną, pobrane i przygotowane implanty cięto i badano w kilku miejscach pomiarowych.

Badania stopnia przerastania implantów tkanką kostną przeprowadzono na podstawie obserwacji obrazów mikroskopowych z zastosowaniem mikroskopii świetlnej oraz skaningowej mikroskopii elektronowej, z wykorzystaniem mikroskopu Phenom G2pro, przy napięciu przyspieszającym 5 kV. Archiwizację obrazów przedstawiono w postaci zarejestrowanych fotografii stosując powiększenia od 120x do 15000x.

Badania RTG

Rentgenogramy kości udowych z implantami wykonywano z zastosowaniem mammografu w warunkach parametrów technicznych 35 kV i 10 mA. Czas ekspozycji był regulowany automatycznie przy pomocy komór AEC. Zastosowano małe ognisko lampy – 0,1 mm. Odległość ognisko lampy – przedmiot badania wynosił 75 cm. Stosowano również ruchomą kratkę przeciwrozproszeniową. Zdjęcia wykonywano w dwóch prostopadłych do siebie projekcjach.

W oparciu o wykonane rentgenogramy ocenie poddano obrazy wszczepów, a przede wszystkim reakcję tkanki kostnej otaczającej wszczepione implanty. Analizowano typowe objawy reakcji tkanki kostnej pod postacią osteolizy, osteosklerozy dookoła kanału implantacyjnego, jak również objawy odczynów okostnowych, stopień wypełnienia kanału kostnina i tendencji do zasklepienia otworu implantacyjnego przez tkankę kostną.

Wyniki

Implanty zwarte o symbolu „TH0”

Badania makroskopowe

W badaniach makroskopowych zarówno 1, 3 jak i 6 miesięcy po wszczepieniu obraz był podobny. Rany skórne były prawidłowo zagojone przez rychłozrost. Krętarze kości udowych zachowywały wielkość i kształt prawidłowy. Po przecięciu podłużnym lokalizowano cylindryczne próbki litej ceramiki, widoczne w zbitej i gąbczastej tkance kostnej, w niszach o gładkiej błyszczącej powierzchni, z których z łatwością dawały się usunąć (ryc. 2).



Ryc. 2. Obraz makroskopowy 6 miesięcy po implantacji zwartej ceramiki na bazie TiO_2 w kość udową królika. W podłużnym przekroju kości udowej widoczna gładka powierzchnia niszy po usuniętym implancie. (strzałka)

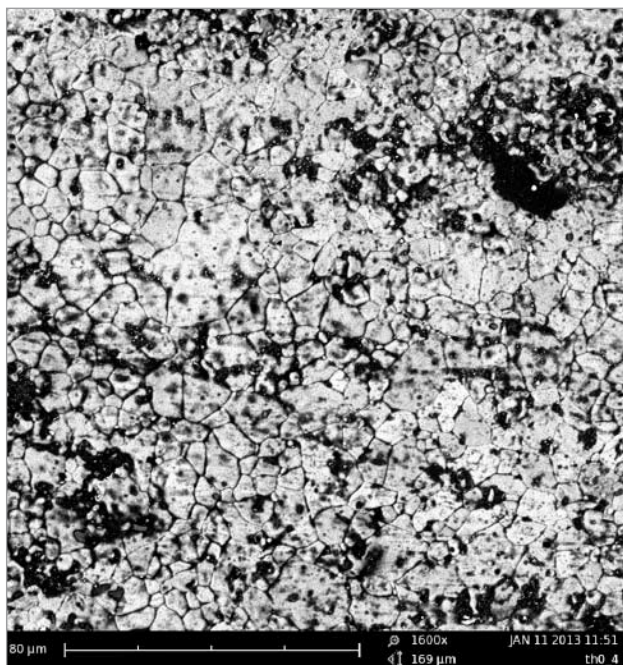
Fig. 2. Macroscopic view 6 months after implantation of solid ceramic on basis TiO_2 into femoral bone rabbit. The smooth surface of the niche after the removed implant is visible in the longitudinal section of femoral bone (arrow)

Badania mikroskopowe

Ze względu na zwartą budowę materiału TH0 badania SEM przeprowadzono dla powierzchni wszczepu.

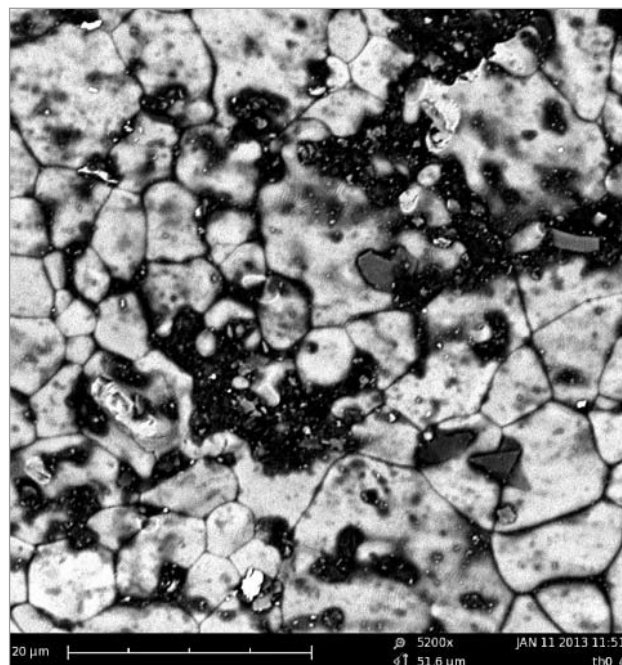
Struktura powierzchni próbek z ceramiki zwartej w skaningowej mikroskopii elektronowej, po 1, 3 i 6 miesięcznym kontakcie z tkanką kostną miała wygląd niezmieniony. Na części powierzchni widoczne były nieregularne pozostałości substancji międzykomórkowej – blaszki kostne i komórki tkanek podporowych. Po 1 miesiącu od

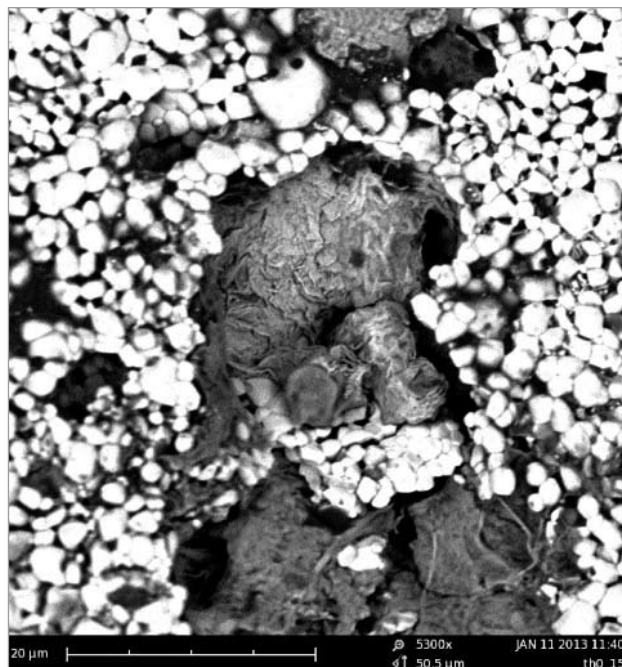
implantacji na powierzchni wszczepu widoczne były pozostałości substancji międzykomórkowej oraz nieliczne, pojedyncze komórki. W 3 miesiącu widoczne były drobne, nieregularne blaszki kostne o cechach tkanki kostnej splotowatej i blaszkowatej oraz pojedyncze sferyczne komórki, których wielkość i morfologia wskazywała na osteoblasty. Po 6 miesiącach w zagłębieniach materiału widoczne były, liczniejsze niż w poprzednich terminach, pozostałości substancji międzykomórkowej oraz blaszki tkanki kostnej (ryc. 3–5).



Ryc. 3. Mikrostruktura powierzchni ceramicznych próbek zwartej (TH0) po 1-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Powierzchnie pokryte częściowo pozostałościami substancji międzykomórkowej, widocznymi w zagłębieniach materiału

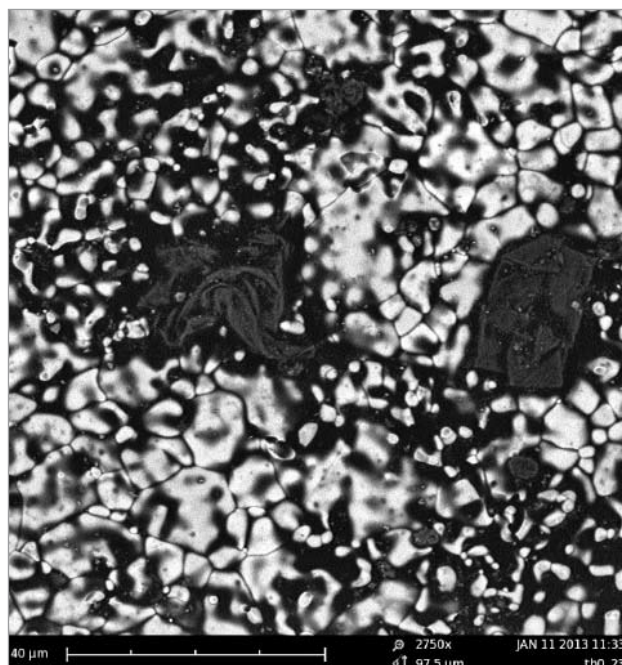
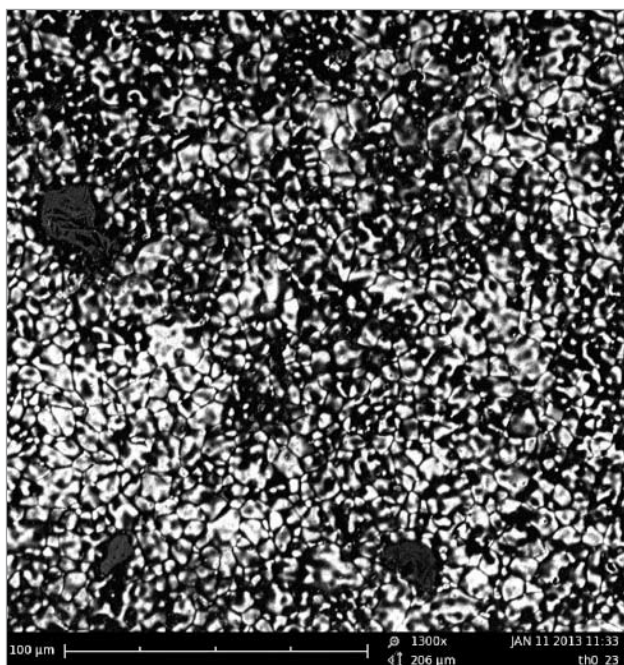
Fig. 3. Microstructure of surface of solid ceramic sample (TH0) after 1 month exposition in the living body. The surfaces partially covered with the residues of extracellular substance, visible in the wells of material





Ryc. 4. Mikrostruktura powierzchni ceramicznych próbek zwartych (TH0) po 3-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Na powierzchni widoczne blaszki splotowatej i blaszkowatej tkanki kostnej oraz pojedyncze sferyczne komórki

Fig. 4. Microstructure of surface of solid ceramic sample (TH0) after 3 months exposition in the living body. On the surface the lamellas of woven and laminar bone tissue and single spherical cells are visible



Ryc. 5. Mikrostruktura powierzchni ceramicznych próbek zwartych (TH0) po 6-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Powierzchnia pokryta równomiernie pozostałościami substancji międzykomórkowej i blaszkami tkanki kostnej

Fig. 5. Microstructure of surface of solid ceramic sample (TH0) after 6 months exposition in the living body. Surface covered evenly with the residues of extracellular substance and lamellas of bone tissue

Implanty makroporowate o symbolu „TH0-90”

Badania makroskopowe

W czasie badań sekcyjnych stwierdzono prawidłowe zagojenie skórnych ran pooperacyjnych przez rychłozrost. W badaniach makroskopowych krętarzy kości udowych 1, 3 jak i 6 miesięcy po wszczepieniu, implanty znajdowano w zbitej i gąbczastej tkance kostnej, z którą były silnie związane. Usunięcie próbek prowadziło do usunięcia fragmentów otaczających tkanek. W porach implantów widoczne były masy tkankowe (ryc. 6).



Ryc. 6. Obraz makroskopowy 6 miesięcy po implantacji ceramiki porowatej na osnowie TiO_2 w kość udową królika. W podłużnym przekroju kości udowej widoczna nierówna powierzchnia niszy po usuniętym implantacie. (strzałka)

Fig. 6. Macroscopic view 6 months after implantation of porous ceramic on the basis TiO_2 into femoral bone of rabbit. The uneven surface of the niche after removed implant is visible in the longitudinal section of femoral bone (arrow)

Badania mikroskopowe

W mikroskopie skaningowym SEM przeprowadzono obserwacje zarówno powierzchni zewnętrznej ceramiki, jak i przekrojów struktur wewnętrznych.

Analiza powierzchni zewnętrznej implantów TH0-90

W skaningowej mikroskopii elektronowej na powierzchni implantów makroporowatych TH0-90 po 1, 3 i 6 – miesięcznym kontakcie z tkanką kostną, widoczne były komórki lub uformowane tkanki podporowe.

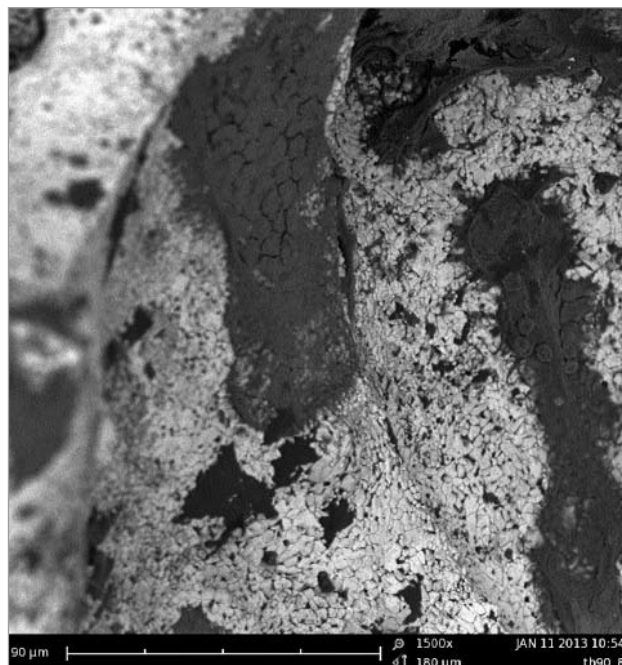
W obrazie mikrostruktury wszczepu po 1 miesiącu część przestrzeni wszczepu – niezależnie od położenia względem centrum – była penetrowana przez adherujące komórki z wysuniętymi filopodiami o cechach osteoblastów, natomiast część pozostawała wolna.

Obraz po 3 i 6 miesiącach od implantacji był podobny. Nierówną powierzchnię wszczepów pokrywały i wypełniały liczne blaszki o charakterze tkanki kostnej splotowatej (grubowłóknistej), z nieregularnym układem wiązek kolagenowych. Stopień zasiedlenia nierównej powierzchni znacząco wzrastał w porównaniu do okresu 1-miesięcznego (ryc. 7–9).

Analiza struktury wewnętrznej implantów TH0-90

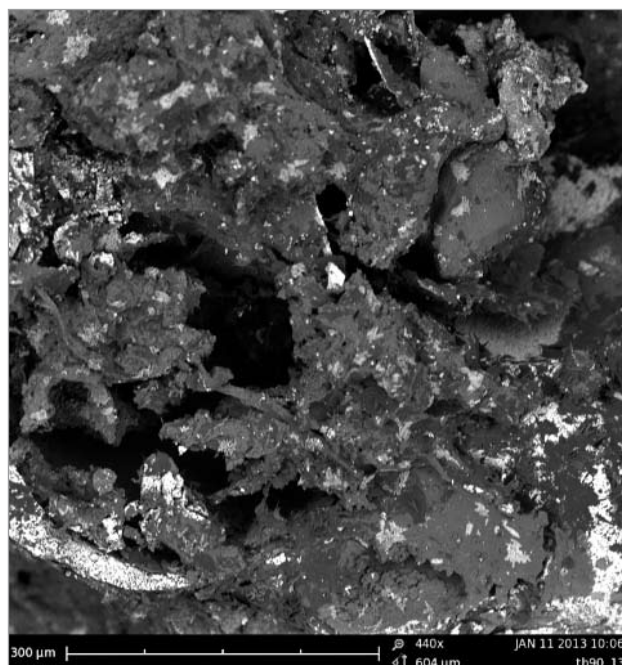
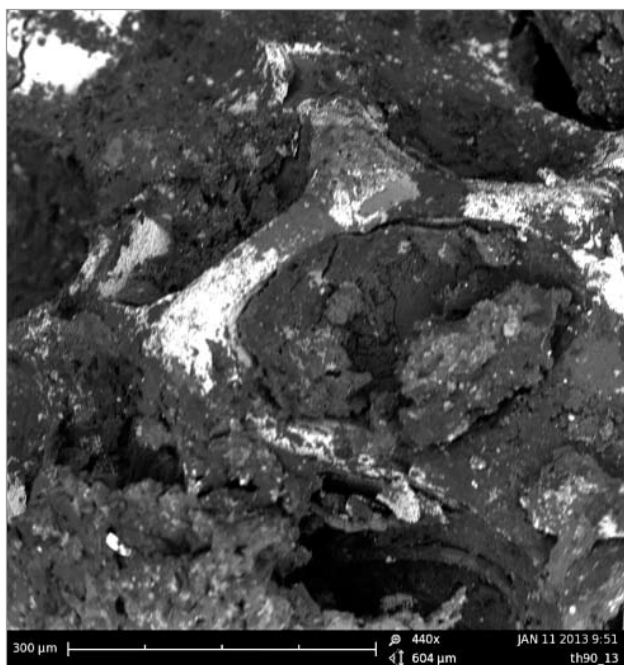
Poza obserwacją powierzchni implantów, przeprowadzono również obserwacje przerastania tkankami podporowymi wewnętrznej struktury porowatej wszczepów. W makroporach zaobserwowowano obecność zarówno komórek adherujących, jak i blaszek o cechach splotowatej (grubowłóknistej) oraz blaszkowatej tkanki kostnej. Analiza obrazów SEM powierzchni przekrojów poprzecznych implantu, wykazała jego penetrację na całej powierzchni. Część przestrzeni niezależnie od położenia względem centrum była penetrowana, część pozostawała wolna.

Na powierzchni przekrojów implantów z ceramiki porowatej TH0-90 po 1 i 3 – miesięcznym kontakcie z tkanką kostną widoczne były adherujące komórki z filopodiami o cechach osteoblastów i tkanki podporowe o cechach grubowłóknistej tkanki kostnej penetrujące wewnątrz. Po 6 miesiącach od wszczepienia w makroporach widoczna była blaszkowata tkanka kostna, ale także sferyczne komórki nierozpłaszczone, o cechach osteoblastów z wypustkami łączącymi komórki i z niewielką ilością substancji międzykomórkowej o słabej kondycji (ryc. 10–12).



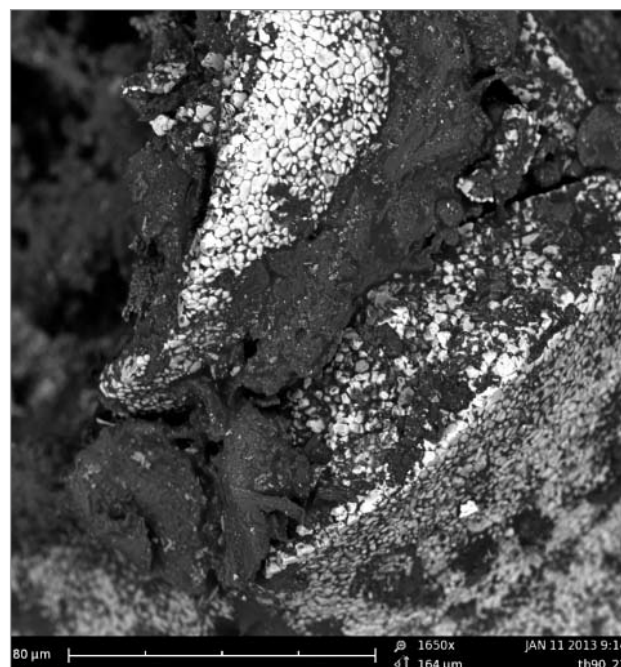
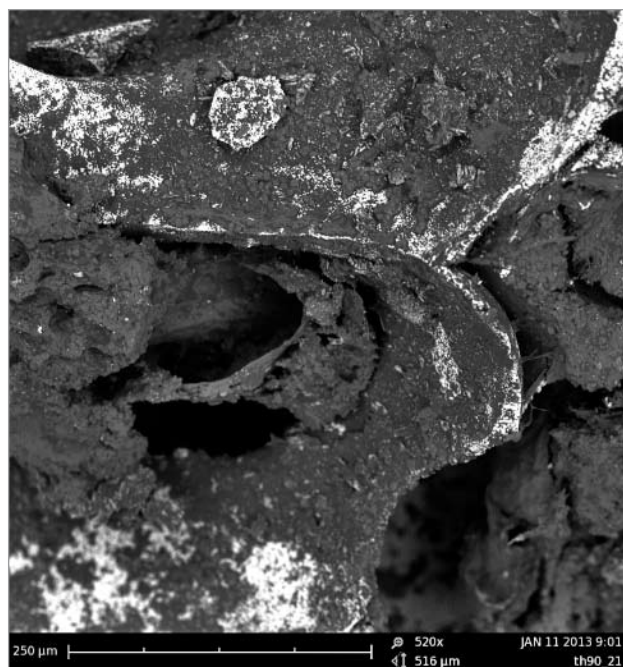
Ryc. 7. Mikrostruktura powierzchni próbek ceramiki porowatej (TH0-90) po 1-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Implanty częściowo pokryte komórkami. Widoczne osteoblasty z filopodiami, adherujące do nierównej powierzchni materiału

Fig. 7. Microstructure of the surface of porous ceramic sample (TH0-90) after 1 month exposition in the living body. Implants partly covered with cells. Osteoblasts with filopodiums adhering to the uneven surface are visible.



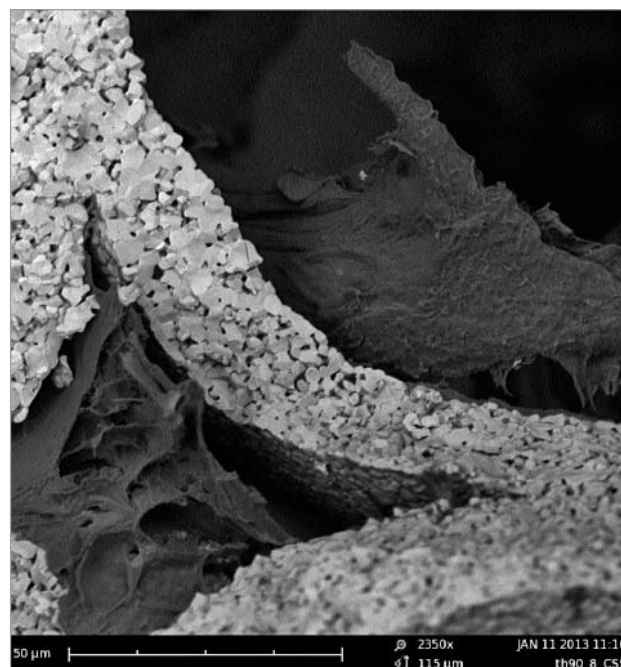
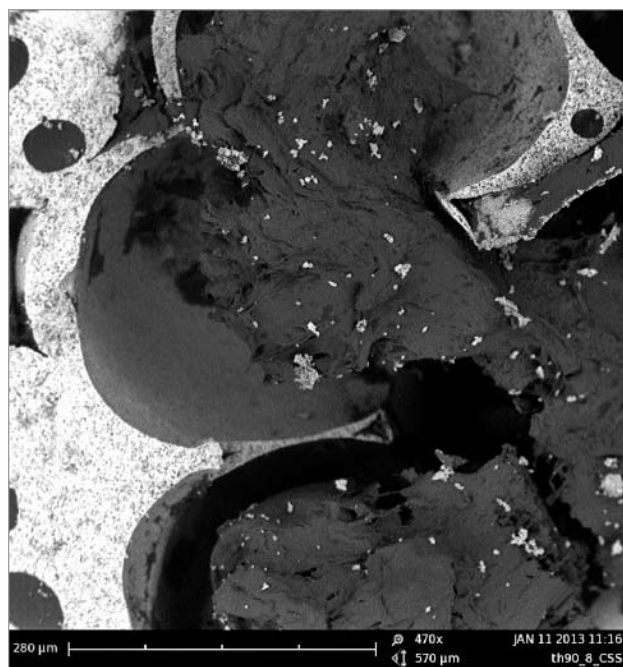
Ryc. 8. Mikrostruktura powierzchni próbek ceramiki porowatej (TH0-90) po 3-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Porowatą powierzchnię wszczepu pokrywają i wypełniają blaszki o cechach tkanki kostnej grubowłóknistej

Fig. 8. Microstructure of the surface of porous ceramic sample (TH0-90) after 3 months exposition in the living body. The porous surface of the graft filled and cover with lamellas with features of woven bone tissue



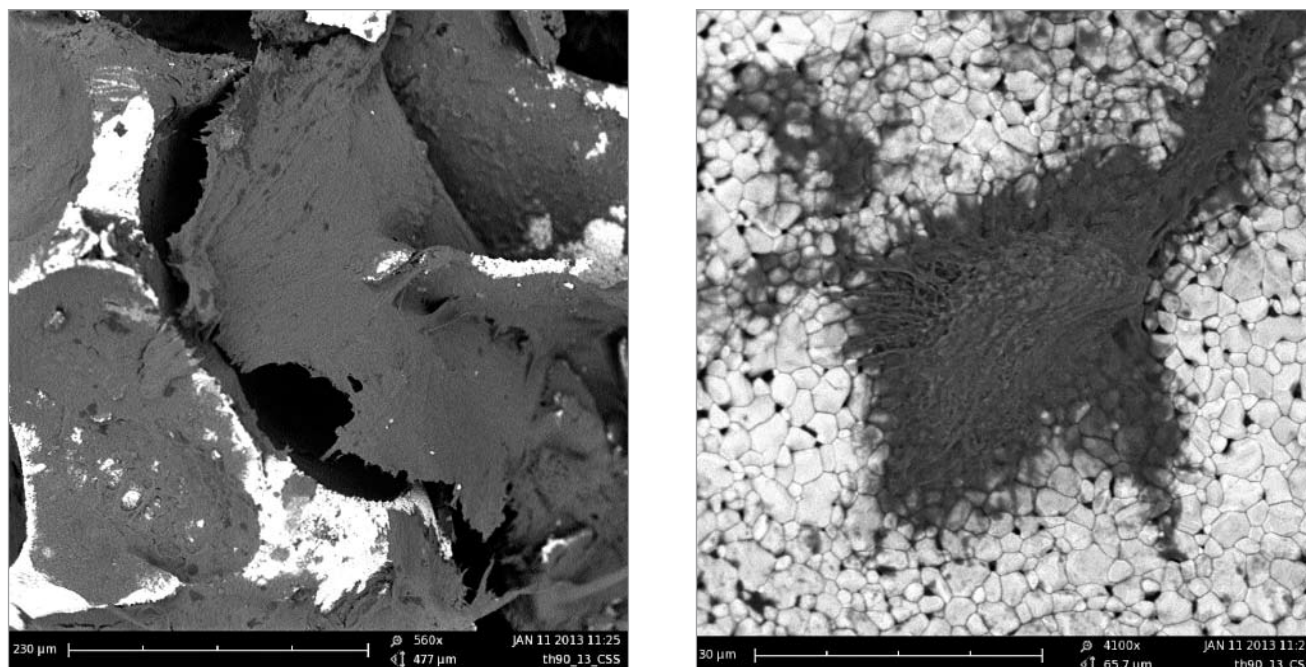
Ryc. 9. Mikrostruktura powierzchni próbek ceramiki porowatej (TH0-90) po 6-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Na białawych ściankach implantu widoczne są blaszki grubowłóknistej i blaszkowatej tkanki kostnej

Fig. 9. Microstructure of the surface of porous ceramic sample (TH0-90) after 6 months exposition in the living body. Lamellas of woven and laminar bone tissue are visible on the whitish implant walls



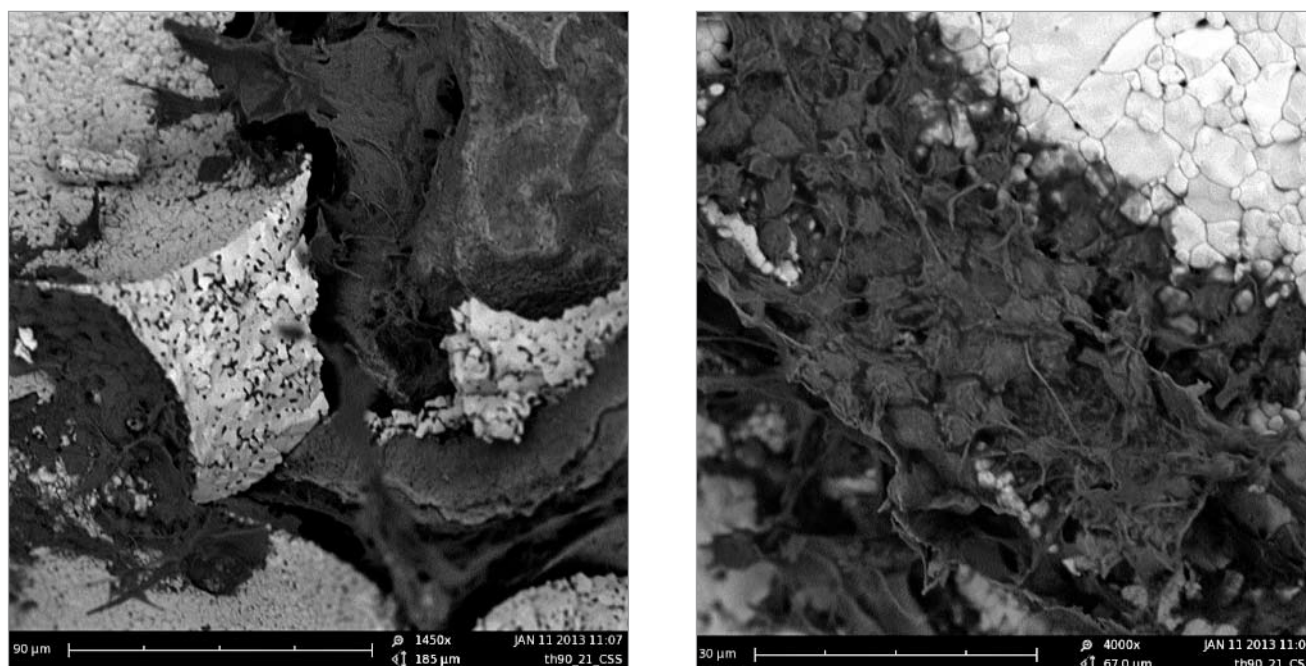
Ryc. 10. Mikrostruktura przekroju próbki ceramiki porowatej (TH0-90) po 1-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Makropory wszczepu wypełnione tkankami podporowymi o cechach grubowłóknistej tkanki kostnej

Fig. 10. Microstructure of the section of porous ceramic sample (TH0-90) after 1 month exposition in the living body. Macropores of the graft filled with the supporting tissues with features of woven bone tissue



Ryc. 11. Mikrostruktura przekroju próbki ceramiki porowatej (TH0-90) po 3 – miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Po lewej powierzchnie pokryte blaszkami kostnymi. Po prawej widoczne skupisko komórek o cechach osteoblastów z licznymi filopodiami

Fig. 11. Microstructure of the section of porous ceramic sample (TH0-90) after 3 months exposition in the living body. On the left the surface covered with the bone lamellae. On the right aggregation of the cells with features of osteoblasts with numerous filopodiums



Ryc. 12. Mikrostruktura przekroju próbki ceramiki porowatej (TH0-90) po 6-miesięcznej ekspozycji w organizmie żywym. Po lewej fragmenty blaszkowatej tkanki kostnej. Po prawej skupisko sferycznych komórek o cechach nierozpłaszczonych osteoblastów

Fig. 12. Microstructure of the section of porous ceramic sample (TH0-90) after 6 months exposition in the living body. On the left fragments of laminar bone tissue. On the right spherical cells with features of unflattened osteoblasts

Wyniki badań rentgenowskich

Implanty zwarte o symbolu „TH0”

Wszczepy były intensywnie wysycone. Wejście do kanałów wszczepowych pozostawały otwarte w 1 i 3 miesiącu, a w pojedynczym wypadku częściowo także w 6 miesiącu po implantacji. Kanały wszczepowe były wypełnione kostniną częściowo w 1 miesiącu i całkowicie w późniejszych terminach. We wszystkich terminach badawczych stwierdzono śladowy odczyn osteolityczny. Po 3 miesiącach obserwowano śladowy odczyn okostnowy, a po 6 miesiącach także śladowy odczyn osteosklerotyczny.

Implanty makroporowate o symbolu „TH0-90”

Wszystkie badane implanty porowate były intensywnie wysycone i niejednorodne. Wejścia do kanałów wszczepowych w 1 i 3 miesiącu po implantacji pozostawały otwarte, a w 6 miesiącu były zamknięte. Kanały wszczepowe we wszystkich terminach badawczych były wypełnione kostniną.

W żadnym z terminów badawczych nie stwierdzono odczynu okostnowego, natomiast we wszystkich terminach obserwowano odczyn sklerotyczny częściowy po 1 i 3 miesiącach i śladowy po 6 miesiącach. Po 3 i 6 miesięcznej implantacji stwierdzono śladowy odczyn osteolityczny.

Dyskusja i omówienie wyników

Morfologia komórek tkanek podporowych kolonizujących powierzchnie tworzywa, pozwalała na charakterystykę ich stanu funkcjonalnego m. in. adhezji, proliferacji, sekrecji związków chemicznych w warunkach *in vitro*, oraz wydzielania substancji międzykomórkowej, stopnia zróżnicowania do tkanek w badaniach implantacyjnych.

W badaniach nad wpływem cech powierzchni materiału, determinujących odpowiedź komórkową *in vitro*, Stodolak wykazała topografię, zwilżalność, twardość, skład chemiczny i energię powierzchniową [4].

W badaniach nad implantami metalicznymi zbudowanymi z Ti6/4V, Ask i wsp. wskazał, że nadrzędnym parametrem w procesie adhezji osteoblastów w warunkach *in vitro* pozostawała chropowatość powierzchni [5].

Wzrastającą zdolność osteoblastów do adhezji na materiale porowatym wykazał także w badaniach *in vitro* Webster et al. [6]. Wyniki te potwierdzili także Parikh i wsp. oraz Koźlik i wsp. stwierdzając, że naturalna porowatość i szorstkość preparatu pozwalała na migrację komórek do wnętrza i waskularyzację wszczepu [7, 8].

Podobnie Zinger i wsp. stwierdzili, że osteoblasty w warunkach *in vitro* na powierzchniach biomateriałów gładkich adherują słabo i nierównomiernie, nie osiągając w rozplaszczeniu typowych wielkości 50 μm . W badaniach oddziaływania z powierzchnią tytanu wygenerowanie porowatej powierzchni o wielkości porów 30–100 μm , spowodowało statystycznie znaczącą proliferację osteoblastów [9].

Według Jansena i wsp. możliwości proliferacyjne komórek tkanek podporowych można zwiększyć, przez rozwinięcie powierzchni w postaci porów połączonych. Jansen i wsp. określili także, że optymalna wielkość porów dla osteoblastów, umożliwiająca jednocześnie rozwój prawidłowej tkanki kostnej, waha się od 50 do 200 μm [10].

W badaniach własnych wytworzono materiał ceramiczny z TiO_2 o wysokich wartościach wytrzymałości mechanicznej, dużym stopniu spiecenia, minimalnej mikroporowatości i maksymalnej gęstości. Z materiału tego wytworzono wszczepy ceramiczne, które miały identyczny skład chemiczny i fazowy, a różniły się strukturą.

Wprowadzona modyfikacja struktury drugiego rodzaju wszczepu – makroporowatość ceramiki porowatej, umożliwiła jego penetrację tkankami podporowymi w całej objętości w 1, 3, 6 miesiącu po implantacji, choć proces ten przebiegał z różnym nasileniem w poszczególnych terminach badawczych dla powierzchni zewnętrznych i wewnętrznych wszczepu i nie był zakończony w 6 miesiącu po implantacji. Na zewnętrznych powierzchniach – krzywiznach wszczepu porowatego w okresie wczesnym tj. po 1-miesięcznym kontakcie z tkanką kostną widoczne były liczne rozplaszczone, adherujące komórki z filopodiami o cechach osteoblastów. W 3 miesiącu zewnętrzne powierzchnie i pory implantów wypełniała tkanka podporowa o cechach grubowłóknistej tkanki kostnej, o nieregularnym układzie blaszek i włókien. W 6 miesiącu słabiej widoczna była aktywność komórkowa, a wypełniająca makropory tkanka miała miejscami bardziej regularny układ włókien i cechy blaszkowatej tkanki kostnej.

Dla wszczepów porowatych przeprowadzono również ocenę przerastania tkanką wewnętrznymi przestrzeniami próbek. Zaobserwowowano, że powierzchnie wewnętrzne porów były zasiedlane w całej przestrzeni dość intensywnie w 1 i 3 miesiącu, po 6 miesiącach obserwowano wykształcone blaszki kostne obok aglomeracji nierozplaszczonych, sferycznych komórek z minimalnymi ilościami substancji międzykomórkowej. W porównaniu do zmian powierzchniowych procesy wewnątrz implantu były opóźnione, a ilości wytworzonej substancji pozakomórkowej mniejsze. Kondycja obserwowanych komórek była obniżona.

Podobny obraz w SEM wczesnej skutecznej adhezji osteoblastów do powierzchni biogodnego nanokompozytu Ti-10%wag w warunkach *in vitro* wykazała Jurczyk. Osadzone na powierzchni spłaszczone osteoblasty adherowały do podłoża z wytworzeniem licznych

filopodiów. Na materiałach trawionych – porowatych, adhezja była skuteczniejsza, choć ilość obserwowanych filopodiów była mniejsza. W okresach późniejszych powierzchnie tworzywa pokrywała jednolita warstwa – monolayer, charakterystyczna dla warunków hodowli komórkowej na powierzchniach płaskich [11].

W badaniach wzrostu komórek na różnych tworzywach w warunkach *in vitro* wg Stodolak, „osteoblasty na biogodnej powierzchni ulegają rozplaszczaniu, co jest konieczne dla aktywności metabolicznej i przygotowania do dalszych cykli podziałowych” [2].

Wykonane badania radiologiczne wykazały nieco inną dynamikę zmian wokół wszczepów zwartych i porowatych wykonanych na osnowie TiO₂. Wokół wszczepów porowatych stwierdzano odczyn osteosklerotyczny i wypełnienie kostną we wcześniejszych okresach badawczych, w porównaniu do analogicznych zmian obserwowanych wokół implantów zwartych. Śladowy odczyn osteolityczny stwierdzony wokół obydwu rodzajów wszczepów obserwowano w późniejszych terminach badawczych wokół porowatych implantów, w porównaniu do zmian wokół implantów w postaci zwartej.

Wykonane badania radiologiczne nie są w stanie odpowiedzieć na pytania dotyczące struktury samych implantów, jednakże są dobrą metodą do całościowej oceny reakcji na obcy materiał wprowadzony w strukturę tkanki kostnej, jak i na uraz wywołany samym zabiegiem implantacji. Błazki osteosklerotyczne w kanale kostnym, zwykle milimetrowej długości, jak i mikroogniska osteolityczne, nie wpływały w żaden sposób na tworzenie kostniny w kanale wszczepowym.

Wniosek

1. Porowata struktura wszczepu w sposób korzystny wpływa na proces wgajania się implantu w kość zwierzęcia doświadczalnego. Dzięki tej strukturze ceramika wykazuje właściwości osteokondukcyjne. Wgajanie ceramiki rozpoczyna się około 1 miesiąca po implantacji, a po 6 miesiącach proces ten nie jest w pełni zakończony.

Literatura

- [1] Michałowski S., Jaegermann Z.: Opracowanie technologii otrzymywania nowych wszczepów ceramicznych na osnowie TiO₂ do zastosowań w chirurgii kości – badania wstępne. Prace Instytutu Szkła, Ceramiki, Materiałów Ogniotrwałych i Budowlanych, (2009), 4, 29–44.
- [2] Majewski S., Malisz P., Dutkiewicz J., Majewski P., Janus A.: Badanie struktur powierzchniowych niezintegrowanych implantów dentystycznych, (Biomet 3i, Osteopant HEX) z zastosowaniem mikroskopii elektronowej i rentgenowskiej analizy spektrometrycznej. Implantoprotetyka (2010), XI, 4, 41.
- [3] Dominiak M., Żywicka B.: Poekstrakcyjne procesy gojenia się tkanki miękkiej i kostnej wyrostka zębodołowego. Podstawy chirurgii stomatologicznej; Wrocław AM. (2010), 113–129.
- [4] Stodolak E.: Badania nad modyfikacją powierzchniową i wpływem włókien na materiał polimerowy i odpowiedź komórkową, praca doktorska, Akademia Górniczo-Hutnicza, Kraków 2006.
- [5] Ask M., Lusamawa J., Kasemo B.: Preparation and surface spectroscopic characterization of oxide films on Ti6/4v, Appl Surf Sci (1988), 35, 283–301.
- [6] Webster T., Doremus R., Siegel W., Bizios R.: Enhanced functions of osteoblasts on nanoparticles ceramics, Biomaterials, (2000), 21, 1803–1810.
- [7] Parikh S.N.: Bone graft substitutes: past, present, future. J. Postgrad. Med. (2002), 48, 142.
- [8] Koźlik M., Wojcicki P., Rychlik D.: Preparaty kośćcozastępcze. Dent. Med. Probl. (2011), 48, 4, 547–553.
- [9] Zinger O., Anselme K., Denzer A., Habersetzer P., Wieland M., Jeanfils J., Hardouin P., Landolt D.: Time dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale resolved topography. Biomaterials (2004), 25, 2695–2711.
- [10] Jansen J., von Recum J.: Textured and porous materials; Biomaterials Science; An Introduction to Materials in Medicine, Elsevier Science & Technology Books 2002, 218–224.
- [11] Jurczyk K.: Badania właściwości chemicznych, mechanicznych fizykochemicznych i biokompatybilności nanokompozytów tytan–ceramika w warunkach *in vitro*, praca doktorska, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu 2010.

Badania wykonano w ramach projektu ST 620 Uniwersytetu Medycznego w Wrocławiu

Adres do korespondencji:

Bogusława Żywicka
Zakład Chirurgii Eksperymentalnej i Badania Biomateriałów
Uniwersytet Medyczny
ul Poniatowskiego 2
43–326 Wrocław
boguslawa.zywicka@umed.pl

