

## PRACE ORYGINALNE

Magdalena Cieślik<sup>1</sup>, Agata Cieślik-Bielecka<sup>2</sup>, Marek Adwent<sup>2</sup>, Daniel Sabat<sup>3</sup>,  
Grzegorz Bajor<sup>4</sup>, Tadeusz Cieślik<sup>2</sup>, Monika Wysoczańska<sup>2</sup>

### Obserwacje gojenia ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem glikolidu z laktydem z dodatkiem hydroksyapatytu – badania wstępne

<sup>1</sup> Z Katedry i Zakładu Materiałoznawstwa Stomatologicznego ŚAM, Bytom

<sup>2</sup> Z Katedry i Kliniki Chirurgii Szcękowo-Twarzowej ŚAM, Zabrze

<sup>3</sup> Z Katedry i Zakładu Patomorfologii ŚAM, Zabrze

<sup>4</sup> Z Katedry Chirurgii Dziecięcej ŚAM, Bytom

*Praca miała na celu ocenę wybranych właściwości biologicznych kompozytu otrzymanego z biodegradowalnego kopolimeru glikolidu z laktydem z dodatkiem hydroksyapatytu w warunkach dotkankowej implantacji. Wykonano badania na zwierzętach, a uzyskane wyniki poddano ocenie klinicznej, radiologicznej i histopatologicznej. Uzyskane wyniki badań wykazały, iż badany materiał nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych. W badaniach wstępnych obrazy histopatologiczne ujawniły obecność złogów matrycy polimerowej oraz hydroksyapatytu w świetle ubytku kostnego. Świadczyło to zarówno o trwającym procesie degradacji kompozytu jak i, co się z tym ściśle wiąże, niezakończonym jeszcze procesie odnowy tkanki kostnej.*

**Słowa kluczowe:** biomateriały, polimery biodegradowalne, kopolimer P(LLA/GLA), hydroksyapatyt, regeneracja tkanki kostnej, badania na zwierzętach

#### **Observations of rabbits mandible osseous wounds healing filled by lactide-glycolide co-polymer with addition of hydroxyapatite – preliminary research**

*The main purpose of this investigation was estimation of some biological properties of biodegradable lactide-glycolide co-polymer with addition of hydroxyapatite. The results of the research subjected to clinical, radiological and histopathological estimation. The tested material caused lack of local and general negative reactions, the process of osseous tissue regeneration wasn't finished in the initial periods of the histopathological investigations. Besides there were the scraps of hydroxyapatite and polymer matrix in the place where the graft was removed from. It's evidence that the process of degradation of tested material wasn't finished yet.*

**Key words:** biomaterials, biodegradable polymers, lactide-glycolide co-polymer, hydroxyapatite, osseous tissue regeneration, experiments on animals

#### **WPROWADZENIE**

Duży postęp w rozwoju takich dziedzin jak chirurgia rekonstrukcyjna czy zabiegowa stymulacja wzrastające z dnia na dzień ogromne zapotrzebowanie na wszelkiego rodzaju wszczepy. Konieczne staje się opracowywanie coraz to doskonalszych materiałów o zadowalających właściwościach mechanicznych, fizykochemicznych czy

biologicznych. Obecnie jako biomateriały stosuje się niezliczoną ilość tworzyw metalicznych, polimerowych, węglowych czy ceramicznych. Kompozyty tworzone z ich udziałem odznaczają się coraz to doskonalszymi właściwościami z punktu widzenia biomechaniki czy medycyny praktycznej [3]. Wyjątkowo szczególne miejsce w aspekcie biologicznym, funkcjonalnym ale także ekono-

micznym zajmują materiały, które po spełnieniu swojej funkcji w organizmie ulegają procesom resorpcji czy degradacji [4, 5]. Najważniejsze w tej grupie materiały to między innymi alifatyczne poliestry, takie jak polilaktyd (PLA) czy poliglikolid (GLA) oraz kopolimery glikolidu z laktydami (P(LLA/GLA)). Wykonane na ich bazie i stosowane w medycynie wszczepy stwarzają możliwość uniknięcia związanej z dodatkowymi kosztami i powikłaniami reoperacji po zregenerowaniu się tkanek, zmniejszenia czy wręcz zaniechania pobierania przeszczepu z innego organizmu ludzkiego czy też obniżenia ryzyka występowania długotrwałych stanów zapalnych. Ogranicza to ponadto możliwość przeniesienia bakterii, wirusów czy chorób odzwierzęcych, a także stosowania leków immunosupresyjnych. W wielu przypadkach materiały te stymulują tkankę do szybszej i bardziej aktywnej regeneracji niż ma to miejsce w procesach naturalnych [6].

Polimery bioresorbowalne w czystej, niezmodyfikowanej postaci wykorzystuje się głównie do naprawy ubytków tkanek miękkich [14], jako nośniki leków w procesach ich kontrolowanego uwalniania się do organizmu żywego [8, 9], jako podłoża komórkowe w inżynierii tkankowej [1, 15, 19] czy genetycznej [13, 15]. Powodem takich zastosowań są głównie ich niskie parametry wytrzymałościowe, które zawężają ich użyteczność do elementów nieprzenoszących znacznych obciążeń mechanicznych [10, 16]. Wykorzystanie ich jako elementów podporowych czy stabilizujących jest możliwe po stworzeniu kopolimerów tych materiałów, które dodatkowo są wzmacniane różnego rodzaju napełniaczami pochodzenia naturalnego czy syntetycznego. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się włókna węglowe [17, 18] czy włókna wykonane z tego samego materiału co matryca polimerowa (materiały „samowzmacniające”) [20, 21], a także wpływające głównie na bioaktywność powstałego z ich udziałem kompozytu, bioszklą [10] czy hydroksyapatyt (HA) [7, 12].

## MATERIAŁ I METODY

Dla oceny niektórych właściwości biologicznych wykorzystano kompozyt otrzymany z kopolimeru glikolidu z laktydem (18:82) z 15% dodatkiem hydroksyapatytu – P(LLA/GLA)+HA. Syntezę kopolimeru prowadzono, stosując jako inicjator związek o stosunkowo niskiej toksyczności – acetyloacetonian cyrkonu [2].

Kopolimery glikolidu z laktydem są typowymi materiałami termoplastycznymi, dlatego też

przeznaczone do badań próbki w postaci walców o średnicy 3,2 mm otrzymano metodą wtrysku, a następnie poddano sterylizacji w autoklawie. Badania doświadczalne wykonano na 48 królikach, mieszańcach różnej płci, w równej ilości, o wadze od 2600–3200 gramów.

W pierwszym etapie doświadczenia cięciem u podstawy zuchwy dotarto do jej bocznej powierzchni. Frezem wykonano ubytki kostne o średnicy około 3,2 mm, a następnie wypełniano je kopolimerem P(LLA/GLA)+HA u 24 królików – grupa badana. Wykonywano to w taki sposób, że po nawierceniu ubytku mierzono jego głębokość, a następnie docinano z walca o odpowiedniej długości fragment i wtłaczano go w uprzednio przygotowane miejsce. Grupę kontrolną stanowiły 24 króliki, którym w taki sam sposób wykonano ubytki kostne, a następnie pozostawiono je do wypełnienia skrzepem krwi.

Drugi etap polegał na wygoleniu i zdezynfekowaniu skóry na grzbiecie królików, gdzie po obu stronach kręgosłupa lędźwiowego wykonano nacięcia. Pod skórą po stronie lewej wytworzono kieszeń, a po prawej rozwarstwiono mięśnie grzbietu. W oba tak przygotowane miejsca wprowadzono badany materiał. Wszystkie rany zaszywano warstwowo Dexonem. Przez cały okres doświadczenia króliki nie otrzymywały żadnych leków.

Wszystkie zwierzęta poddano obserwacji klinicznej, a po ich zabiciu badaniom radiologicznym w 7 i 21 dobie oraz w 6, 12, 24 i 48 tygodniu doświadczenia, a także badaniom histopatologicznym w 7, 14 i 21 dobie oraz 6, 12, 24 i 48 tygodniu badań. Badaniom histopatologicznym poddano również wątrobę i nerkę zwierząt doświadczalnych.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Obserwacje kliniczne wykazały, iż rany pooperacyjne goiły się w sposób prawidłowy. Nie stwierdzono odczynów zapalnych czy też objawów chęłbotania (brak krwika lub też obfitej wydzieliny przyrannej). Proces gojenia ran przebiegał poprzez rychłozrost i uległ zakończeniu między 10–14 dniem doświadczenia na etapie usuwania szwów.

W początkowych okresach obserwacji wystąpił obrzęk, który był znacznie mniejszy w grupie kontrolnej, a szczególnie zaś zauważalny u zwierząt ze wszczepionym kompozytem. W grupie kontrolnej obrzęk utrzymywał się do 7 doby, natomiast w badanej dało się go zauważyć jeszcze po 14 dobie. W żadnej z grup nie obserwowano

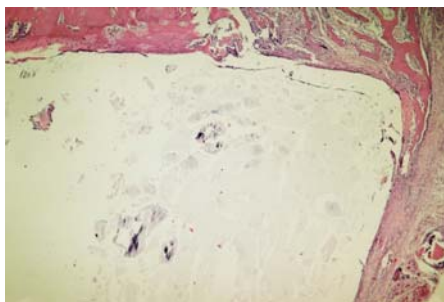
rozchodzenia się ran. Mierne zgrubienia tkanek w grupie badanej można było stwierdzić jeszcze na początku 4 tygodnia obserwacji. Obserwowano ponadto przez cały okres doświadczenia stały przyrost masy ciała królików.

Obrazy radiologiczne po 7 dobach wykazały w obu grupach obecność kulistego przejaśnienia o regularnych brzegach. Jego wielkość była bardzo zbliżona do rozmiarów wykonanego ubytku kostnego. Przejaśnienie to w późniejszych okresach ulegało stopniowemu zmniejszeniu i przybrało nieregularną postać. W początkowych okresach badawczych w grupie badanej miało ono postać obrączkowatą i okalało ubytek kostny. Po 6 tygodniach zjawisko to nie było już dostrzegalne, co świadczyło o ścisłym przyleganiu kości do badanego materiału. Ponadto w grupie badanej po 24 tygodniach badań obserwowano w centralnej części ubytku bardzo wyraźne zacienienia, świadczące albo o nadmiernym kostnieniu albo o nagromadzeniu się w tym miejscu drobin hydroksyapatytu. W ostatnim okresie obserwacji cały ubytek wypełniony był tkanką kostną. Sprawiała ona wrażenie tkanki dobrze zmineralizowanej, nieznacznie różniącej się od otoczenia.

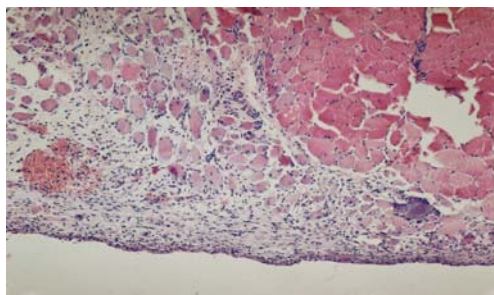
Badania histopatologiczne żuchwy królików po 7 dobach doświadczenia wykazały, iż w obu gru-

pach badawczych ubytek kostny pokryty był młodą tkanką łączną włóknistą. Obserwowano bardzo żywą odbudowę tkanki kostnej w głębi i na jej powierzchni. Po 14 dobach obserwacji, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej, widoczne były młode beleczki kostne pokryte osteoblastami. Po 3-tygodniowym okresie badań ubytek kostny był już wyraźnie uformowany i pokryty dojrzałą tkanką kostną. W grupie badanej zaobserwowano ponadto mgiełkowate złogi matrycy polimerowej i wyraźny hydroksyapatyt w świetle ubytku kości (ryc. 1). Ich obecność mogła świadczyć o toczącym się procesie degradacji i towarzyszącym mu rozpadzie badanego kompozytu.

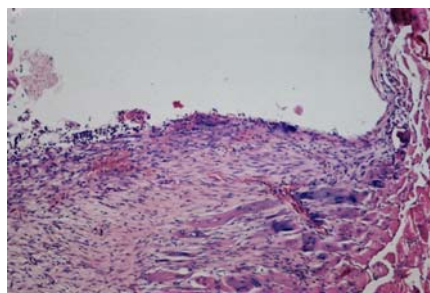
W tkance podskórnej obecna była cienka torebka łącznotkankowa pokrywająca wszczep. Wewnątrz niej obserwowano mgiełkowate złogi matrycy polimerowej i hydroksyapatytu. Po 3 tygodniach obserwacji nastąpiło pogrubienie torebki, w której znajdowały się już włókna kolagenowe. Ponadto w ścianie torebki i wokół niej, w otaczającej tkance obserwowano pojedyncze olbrzymiokomórkowe ziarniniaki typu „około ciała obcego”, które powstały wokół drobin hydroksyapatytu i matrycy polimerowej (ryc. 2). Nie obserwowano wokół torebki odczynu zapalnego.



**RYC. 1** Mgiełkowate złogi polimeru i hydroksyapatytu w świetle kanału wszczepu. Barw. H.E., pow. 50x



**RYC. 2** Ziarniniaki olbrzymiokomórkowe typu „około ciała obcego” w ścianie torebki wokół złogów matrycy polimerowej. Barw. H.E., pow. 200x



**RYC. 3** Regenerujące wielojądrowe włókna mięśni poprzecznie prążkowanych na pograniczu blizny łącznotkankowej z tkanką mięśniową. Barw. H.E., pow. 100x

## PODSUMOWANIE

Z przeprowadzonych badań doświadczalnych wynika, iż kopolimer P(LLA/GLA)+HA nie wywołuje ani miejscowych, ani ogólnoustrojowych negatywnych odczynów tkankowych. Wstępne obserwacje histopatologiczne wykazały, iż zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej proces regeneracji tkanki kostnej po 21 dobie doświadczenia nie uległ jeszcze całkowitemu zakończeniu. Dodatkowo obecność złogów matrycy polimerowej, tak w świetle ubytku kostnego, jak i w powstałej podczas gojenia torebce łącznotkankowej w tkance podskórnej oraz mięśniowej, świadczy o niezakończonym procesie degradacji badanego kopolimeru.

## PIŚMIENNICTWO

1. ABU Bakar M.S., Cheng M.H.W., Tang S.M., YU S.C., Liao K., Tan C.T., Khor K.A., Cheang P., *Tensile properties, tension-tension fatigue and biological response of polyetheretherketone-hydroxyapatite composites for load-bearing orthopedic implants*. *Biomaterials*, 2003, 24(13), 2245.
2. Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grzeb P., Kryczka T., Ryba M., Walski M., *Kopolimery laktydu, glikolidu i ε-kaprolaktonu niezawierające metali ciężkich. Synteza własności i zastosowanie w procesie kontrolowanego uwalniania analogów nukleozydów*, *Inż. Biomat.*, 2002, 21, 23.
3. Będziński R., *Biomechaniczne aspekty stosowania implantów*, *Inż. Biomat.*, 2003, 30–33, 130–140.
4. Böstman O., Pihlajamäki H., *Clinical biocompatibility of biodegradable orthopedic implants for internal fixation: a review*, *Biomaterials*, 2000, 21(24), 2615.
5. Chłopek J., Morawska A., Umańska L., Paluszkiewicz C., *Badanie procesu degradacji kompozytów z polimerów resorbowalnych w warunkach in vitro*, *Inż. Biomat.*, 2004, 38, 132.
6. Gogolewski S., *Biomateriały polimerowe*, [w:] *Biomateriały*, Tom IV, [w:] *Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000* pod red. M. Nałęcza, Akad. Oficyna Wyd. EXIT, Warszawa 2003.
7. Harebko K., Bućko M., Haberkowski M., Mozgawa W., Pyda A., Zarębski J., *Hydroksyapatyt naturalny – preparatyka, właściwości*, *Inż. Biomat.*, 2003, 30, 31, 32, 33.
8. JAIN R.A., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices*, *Biomaterials*, 2000, 2475.
9. Jedliński Z., Juźwa M., *Leki cytotoksyczne na matrycach polimerowych. Nowe perspektywy w terapii nowotworów*, *Inż. Biomat.*, 2001, 17, 21.
10. Kmita G., Chłopek J., *Ocena trwałości kompozytowych śrub polimerowych poddanych stałym obciążeniom w warunkach in vitro*, *Inż. Biomat.*, 2001, 17, 67.
11. Kofron M.D., Laurencin C.T., *Development of calcium phosphate co-precipitate/ poly(lactide-co-glycolide) DNA delivery system: release kinetics and cellular transfection studies*, *Biomaterials*, 2004, 25(13), 2637.
12. Kokubo T., Kim H.M., Kawashita M., *Novel bioactive materials with different mechanical properties*, *Biomaterials*, 2003, 24(13), 2161.
13. Kumar M.N.V.R., Bakowsky U., Lehr C.M., *Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers*, *Biomaterials*, 2004, 25(10), 1771.
14. Lajtai G., Balon R., Humer K., Aitzetmüller G., Unger F., Orthner E., *Resorbable interference screws. Histologic study 4.5 years postoperative*, *Unfallchirurg.*, 1998, 101(11), 866.
15. Pamuła E., Błazewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M., *Bioresorbowalne porowate podłoża dla inżynierii tkankowej z kopolimeru glikolidu z L-laktydem: wpływ mikrostruktury na osteoblasty in vitro*, *Inż. Biomat.*, 2003, 30, 95.
16. Pamuła E., Chłopek J., Błazewicz M., Makinen K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., *Materiały kompozytowe z nowego biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktyd dla celów medycznych*, *Inż. Biomat.*, 2000, 12, 23.
17. Proszek M., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Bajor G., Sabat D., Cieślak T., Morawska A., *Ocena gojenia ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmacnianym włóknami węglowymi*, *Inż. Biomat.*, 2004, 38, 242.
18. Proszek M., *Gojenie ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmacnianym włóknami węglowymi. Rozprawa doktorska*, Śląska Akademia Medyczna, Zabrze 2004.
19. Serino G., Biancu S., Iezzi G., Piattelli A., *Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: filer clinical and histological study in humans*, *Clinical Oral Implants Research*, 2003, 14(5), 651.
20. Tiainen J., Soini Y., Tormala P., Waris T., Ashammakhi N., *Self-reinforced polylactide/polyglycolide 80/20 screws take more than 1(1/2) years to resorb in rabbit cranial bone*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2004, 15;70B(1), 49.
21. Valimaa T., Laaksovirta S., *Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro*, *Biomaterials*, 2004, 25(7–8), 1225.