

BADANIA BIOZGODNOŚCI TKANKOWEJ MATERIAŁU SZ2 OTRZYMANEGO METODĄ ZOL-ŻEL

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, ZAMORSKA L.***, ŁĄCZKA M.***,
CHOLEWA KOWALSKA K.***, ŻOŁNIEREK M.**, MENASZEK E.**,
KOKTYSZ R.****

*KLINIKA ORTOPEDII I ORTOPEDII DZIECIĘCEJ UNIwersYTETU
MEDYCZNEGO W ŁODZI

**ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII COLLEGIUM MEDICUM
UNIwersYTETU JAGIELLOŃSKIEGO W KRAKOWIE

***KATEDRA SZKŁA I EMALII AKADEMII GÓRNICZO HUTNICZEJ W
KRAKOWIE

****ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I CYTOBIOLOGII KLINICZNEJ WYDZIAŁU
WOJSKOWO-LEKARSKIEGO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W
ŁODZI

*Celem badań było określenie charakteru od-
powiedzi komórkowej i stopnia biozgodności
tkankowej dla wszczepionego w mięśnie pośladowe
biomateriału Sz2*

Materiał i metoda

Badania przeprowadzono w Zakładzie Cytobiologii i Histochemii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Do badań zastosowano materiał otrzymany metodą zol-żel, Sz2. Biomateriał wszczepiano w takiej samej ilości do mięśnia szkieletowego pośladowego dorosłych (4-6 miesięcy) szczurów rasy kapturowej. Operacje implantowania biomateriałów przeprowadzono w pełnej narkozie, w warunkach sterylnych. Równocześnie w grupie kontrolnej dokonano identycznego zabiegu bez wprowadzania biomateriału. W grupie doświadczalnej utworzono serie 2, 7, 30, 90, 150 i 180-dniowe, każda składająca się z 12 osobników (6 samic i 6 samców). Ze względu na szybkie zakończenie procesu gojenia się rany w grupie kontrolnej utworzono tylko serie 7 i 30-dniowe składające się z 6 osobników każda (3 samce i 3 samice). Po upływie czasu danej serii zwierzęta uśmiercano dootrzewnowym zastrzykiem z Vetbutalu.

Po uśmierceniu zwierząt z serii 2-dniowej, z wyciętych z mięśnia wszczepów wykonano rozmazy metodą odbitkową. Następnie rozmazy barwiono metodą Pappenheima i

TISSUE BIOCOMPATIBILITY RESEARCH OF THE SZ2 MATERIAL OBTAINED WITH USE OF ZOL-GEL METHOD

NIEDZIELSKI K.*, SYNDER M.*, ZAMORSKA L.**, ŁĄCZKA M.***,
CHOLEWA KOWALSKA K.***, ŻOŁNIEREK M.**, MENASZEK E.**,
KOKTYSZ R.****

* ORTHOPAEDICS AND CHILDREN ORTHOPAEDICS CLINIC MEDICAL
FACULTY OF UNIVERSITY IN LODZ

** CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY DEPARTMENT COLLEGIUM
MEDICUM OF THE JAGIELLONIAN UNIVERSITY IN CRACOW

***CHAIR OF GLASS AND ENAMEL OF UNIVERSITY OF SCIENCE AND
TECHNOLOGY IN CRACOW

****PATHOLOGY AND CYTOPATHOLOGY DEPARTMENT MEDICAL
FACULTY OF MEDICAL UNIVERSITY IN LODZ

*The aim of the study was to determine a char-
acter of cellular response and a degree of
tissue biocompatibility of bio-material Sz2
implanted in the gluteal muscles.*

Material and method

The investigation have been carried out in the Department of Cytobiology and Histochemistry of Collegium Medicum of the Jagiellonian University in Cracow.

The study used a material obtained with use of zol-gel method, Sz2. The biomaterial was implanted in equal portion to the gluteal muscle of adult (4-6 months old) rats of the hooded breed. Procedures of implantation were performed under general anaesthesia, in sterile conditions. Simultaneously the control group underwent the same procedure but without implantation of the bio-material. In experimental group the 2, 7, 30, 90, 150 and 180-days long series were created, each of 12 individuals (6 males and 6 females). Because of the fast ending of the wound healing process only 7 and 30-days long series were created in the control group, each consisting of 6 individuals (3 males and 3 females). After the time passage for the given series animals were sacrificed with Vetbutal injection.

After sacrificing animals from the 2-day long series, implants cut from their muscles were smeared with an imprint

liczono udział procentowy poszczególnych typów leukocytów wśród 200 kolejno napotkanych w obrazie mikroskopowym komórek.

Po uśmierceniu zwierząt ze wszystkich pozostałych serii, pobierano wycinki z miejsca wszczepionego materiału wraz z najbliższą jego okolicą. Wycinki zamrażano w ciekłym azocie i skrawano na mikrotomie kriostatowym w temp. -24°C na skrawki tkankowe o grubości od 6 do $8\ \mu\text{m}$ skrawki te barwiono metodami histochemicznymi wykrywającym aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (G6PD), dehydrogenazy NADH (NADHD), oksydazy cytochromu C (OCC) i fosfatazy kwaśnej (FK) i barwieniu immunohistochemicznemu wykrywającemu fibronektynę. Ponadto w skrawkach barwionych metodą Pappenheima liczono komórki tuczne i eozynofile w przeliczeniu na $1\ \text{mm}^2$ powierzchni wszczepu i jego najbliższych okolic. Prowadzono również obserwacje obecności neutrofilów i makrofagów w okolicach wszczepu. Nasilenie aktywności enzymów oceniano metodą mikrodensytometryczną, a liczebności występowania komórek obronnych określano z pomocą mikrokomputerowo analizatora obrazu Multiscan 6.08. Metodę oceny morfometrycznej oparto o prace M. Therina i in. [1] oraz doświadczenia oparte o wcześniejsze własne badania biogodności tkankowe biomateriałów [2-5].

Wyniki

W rozmazach wykonanych z miejsc wszczepów w 2 dniu od operacji dominował wzrost leukocytów-neutrofilów świadczący o dominującym stanie zapalnym.

W serii 7-dniowej, w rozmazach we wszczepach materiału Sz2, widoczne są już tylko niewielkie skupiska neutrofilów obserwowano natomiast nasilony proces fagocytozy - widoczne są liczne makrofagi wypełnione sfagocytowanym materiałem.

W obrębie wszczepów stwierdzono także napływ komórek tucznych (mastocytów) i eozynofiliów.

Kinetykę pojawiania się komórek tucznych i eozynofiliów pozwalającą wnioskować o przebiegu procesów naprawczych w tkankach przedstawia RYS.1.

Ponadto w serii 7-dniowej stwierdzono w miejscach wszczepionego biomateriału wyraźne zagęszczenie występowania młodych komórek ziarniny już przylegających do fragmentów wszczepionego biomateriału. Notowano także pojawienie się fibronektyny wokół ziaren materiału Sz2 co przemawia za wysoką biogodnością tego biomateriału z plazmolemą komórek i macierzą międzykomórkową.

W serii 30-dniowej nie obserwowano wykładników ostrego stanu zapalnego. We wszczepach widoczne były makrofagi z ciemnymi ziarnistościami, świadczące o przebiegającym procesie usuwania drobnych odłamków biomateriału na drodze fagocytozy. Wzrastała liczba mastocytów, co wskazuje na wzmocnienie procesów budowy tkanki ziarninowej, przebiegających w dużym stopniu pod wpływem czynników wydzielanych przez mastocyty. Równocześnie malała liczebność eozynofiliów w stosunku do serii 7-dniowej, w której obserwowano pierwszy napływ tych komórek.

Aktywność enzymów utleniających (G6PD, NADHD, OCC) we włóknach mięśniowych i komórkach tkanki łącznej już w 30 dniu po implantacji powracała do normy. W serii 90-dniowej widoczne były nadal skupiska makrofagów, ale już mniejsze niż w serii 30-dniowej, a liczba mastocytów i eozynofiliów była obniżona. W serii 150-dniowej obraz wszczepu i tkanek otaczających podobny był do serii 90-dniowej. W okolicach wszczepów biomateriału Sz2, widoczne były niewielkie skupiska makrofagów ze sfagocytowanym materiałem i nieznacznie wzrastała liczebność mastocytów.

method. The smears were subsequently dyed with the Pappenheim method and percentage of various kinds of leucocytes was counted for 200 subsequent cells found on the microscopic image.

After sacrificing animals of all the remaining series segments were collected from the site of the implant, including the implant's vicinity. Segments were frozen in liquid nitrogen and cut on cryostatic microtome at -24°C on tissue segments 6 to 8 mm thick. The segments were dyed with histochemical methods detecting activity of glucose-6-phosphoric dehydrogenase (G6PD), NADH dehydrogenase (NADHD), cytochrome C oxidase (OCC) and acid phosphatase (FK) and dyed immunohistochemically to detect fibronectine. Moreover in the sections dyed with the Pappenheim method mastocytes and eosinophilic leucocytes were counted as for surface of $1\ \text{mm}^2$ of the implant and its close vicinity. Also observations of neutrophils and macrophages presence in the implant area were carried. Intensification of enzymes activity was assessed with micro-densitometric method, and protective cells count was estimated with Multiscan 6.08 computer image analyser. Methodology of morphometric estimation was based on works of M. Therin et al. [1], also on own experience based oneself on the earliest tissue biocompatibility researches of the biomaterials [2-5].

Results

In smears made of implant sites on the second day after the surgery increase of leucocyte - neutrophils number was found which evidences existence of dominating inflammation state.

In the 7-days long series, in smears of implants of S2 material only small clusters of neutrophils were found but increased process of phagocytosis was observed - numerous macrophages filled with phagocytosed material were visible.

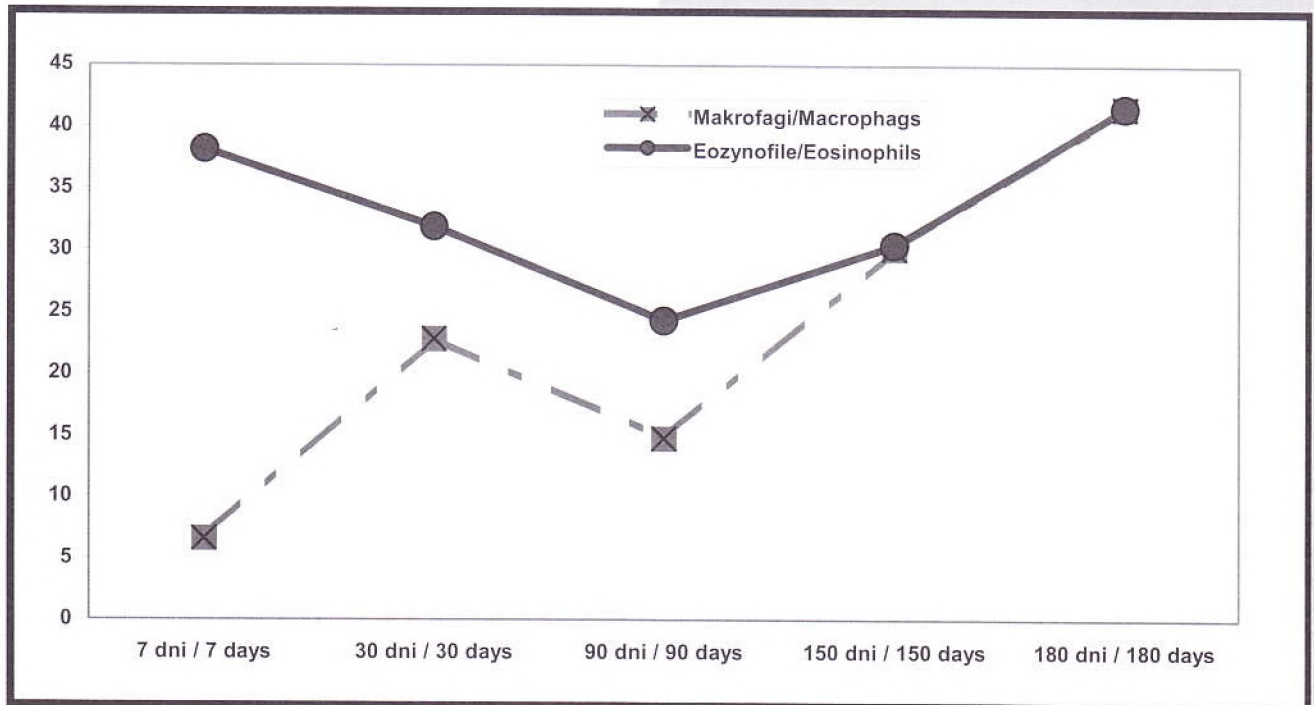
Also inflow of mastocytes and eosinophiles within the implants was found.

Kinetics of mastocytes and eosinophiles appearance enabling conclusions about repair processes in tissues is showed in the FIGURE 1.

Moreover, in the 7-days long series a significant concentration of young granulation cells already adhering to fragments of the implanted material was observed. Fibroectine appearance around granules of S2 material was noted, and this phenomenon suggests high biocompatibility of the material both with cell plasm and intracellular matrix.

In the 30-days long series no evidence of an acute infection was noted. Macrophages with dark granulation were visible within implants, which suggest lasting process of removal of small particles of the biomaterial through phagocytosis. Mastocytes number increased suggesting intensification of granulation tissue construction - a process that is largely activated by factors secreted by mastocytes. Simultaneously eosinophile number decreased comparing to the 7-days long series, where the first inflow of this cells was observed.

Activity of oxidative enzymes (G6PD, NADHD, OCC) in muscle fibres and connective tissue cells was back to normal in just 30 days after the implantation. Clusters of macrophages were still visible in the 90-days long series, but they were smaller than in the 30-days long series, and the number of mastocytes and eosinophiles was decreased. Image of the implant and of the surrounding tissues in the 150-days long series was similar to that of the 90-days long series. Small aggregates of macrophages with phagocytosed material and slight increase of mastocytes number were



RYS. 1. Przeciętna liczebność komórek tucznych (mastocytów i eozynofilów) w 1 mm² przekroju wszczepu biomateriału Sz2w kolejnych seriach.

FIG. 1. Mean value of mastocyte and eosinophile in 1 mm² diameter of biomaterial Sz2 in following series.

W serii 180-dniowej we wszczepach materiału Sz2 liczba mastocytów i eozynofilów wzrasta w porównaniu do poprzednich czasów obserwacji. W okolicach wszczepu tego materiału sporadycznie można było zauważyć niewielkie grupki makrofagów ze sfagocytowanymi ziarnami.

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. Wyniki badań aktywności enzymów w składowych komórkowych przedstawiono na histogramach (RYS. 2).

Proces regeneracji włókien mięśniowych szkieletowych uszkodzonych ale nie pozbawionych łączności z pęczkami nerwowymi, poprzez zachowane płytki neuromotoryczne, przebiegał szybciej w tych miejscach wszczepów, w których rozwijała się intensywnie ziarnina doprowadzająca tworzące się kapilary krwionośne. Ziarnina będąca prekursorem tkanki łącznej włóknistej miejsca urazu została utworzona z przekształconych fibrocytów, fibroblastów oraz komórek mezenchymatycznych (komórki Rougeta) pochodzących z zewnętrznej okrywy nabłonka kapilar krwionośnych. Pobudzenie fibroblastów i w/w komórek mezenchymatycznych do przekształcania się w ziarninę (tkanka naprawcza) następowało dzięki sygnałom chemicznym (czynniki wzrostowe) wydzielanym przez komórki obronne (mastocyty, eozynofile). Fibroblasty, komórki ziarniny, komórki wielojądrowe ziarniny oraz makrofagi cechowały się wysokim nasileniem aktywności fosfatazy kwaśnej (FK) będącej enzymem hydrolytycznym zawartym w lizosomach. FK uczestniczy w fagocytozie złożonego płynu i cząstek stałych a ponadto jest wydzielana na zewnątrz powodując wraz z innymi enzymami lizosomów rozkład obcych złożonych substancji w macierzy międzykomórkowej. Szybsze rozwijanie się ziarniny prowadziło do regeneracji włókien mięśniowych uszkodzonych ale nadal łączących z układem nerwowym.

Włókna mięśniowe wąskie i szerokie usytuowane blisko wszczepu biomateriału wykazywały często obniżenia ak-

tywności w obszarze wszczepu biomateriału Sz2.

found in the area of Sz2 bio-material implantation. In the 180-days long series, in Sz2 material implants number of mastocytes and eosinophils increases comparing to the shorter times of observation. In the implant area sporadic groups of macrophages with phagocited granules could be seen.

During microscopic analysis of the preparations containing histochemically tested tissue sections, progress of tissue regeneration and wound healing was observed along with the activity of selected enzymes. Results of enzymes activity assessment in cellular compositions are showed in histograms (FIG. 2).

A process of regeneration of skeletal muscle fibres that were injured but were not depleted of connection with nervous bundle through preserved myoneural junctions proceeded faster in those places of the implants where granulation tissue developed intensively bringing newly formed capillary vessels. The granulation tissue being precursor of the fibrous connective tissue at the injury site was formed from transformed fibrocytes, fibroblasts and mesenchyme cells (Rouget's cells) coming from the external epithelial cover of capillary vessels. Stimulation of the fibroblasts and mesenchyme cells mentioned above for transformation into granulation tissue (reparative tissue) is due to chemical signals (growth factors) secreted by protective cells (mastocytes, eosinophiles). Fibroblasts, granulation cells, multinuclear granulation cells and macrophages were characterised with high activity of acid phosphatase (FK) which is a hydrolytic enzyme contained in lysosomes. FK, along with other lysosomal enzymes, takes part in phagocytosis of complex liquid and solid particles and is also secreted outside causing decomposition of foreign complex substances in intracellular matrix. Faster development of granulation leads to the regeneration of muscle fibres that were injured but still connected to the nervous system.

Narrow and broad muscle fibres situated close to the bio-material implant showed frequently decrease of oxidative

tywności enzymów utleniających G6PDH i NADDH oraz szczególnie wyraźne obniżenie aktywności OCC. Porównywano aktywność enzymów utleniających włókien mięśniowych w bliskiej okolicy wszczepu z aktywnością tych enzymów we włóknach rozmieszczonych w większej odległości od wszczepu. Włókna mięśniowe dalszej okolicy z reguły cechowała wyższa aktywność OCC, NADDH i G6PDH w porównaniu do włókien rozmieszczonych przy wszczepie. Regenerujące włókna mięśniowe, a więc bliskie miejsca wszczepu, pomimo mniejszych rozmiarów swoich przekrojów cechowały się aktywnością badanych enzymów utleniających podobną do obserwowanej w nieuszkodzonych włóknach mięśniowych. Testowane wszczepione biomateriały nie hamowały możliwości regeneracji tkanki mięśniowej szkieletowej.

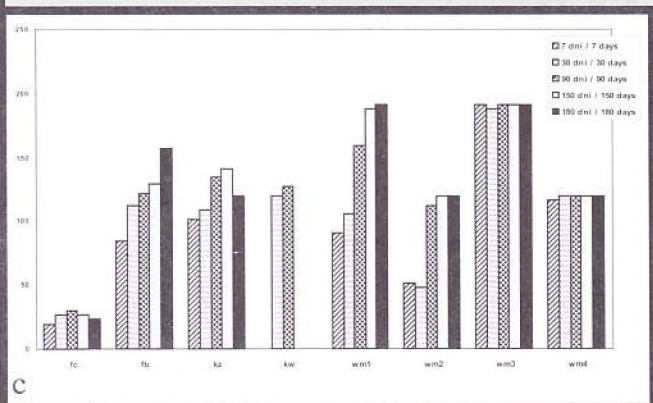
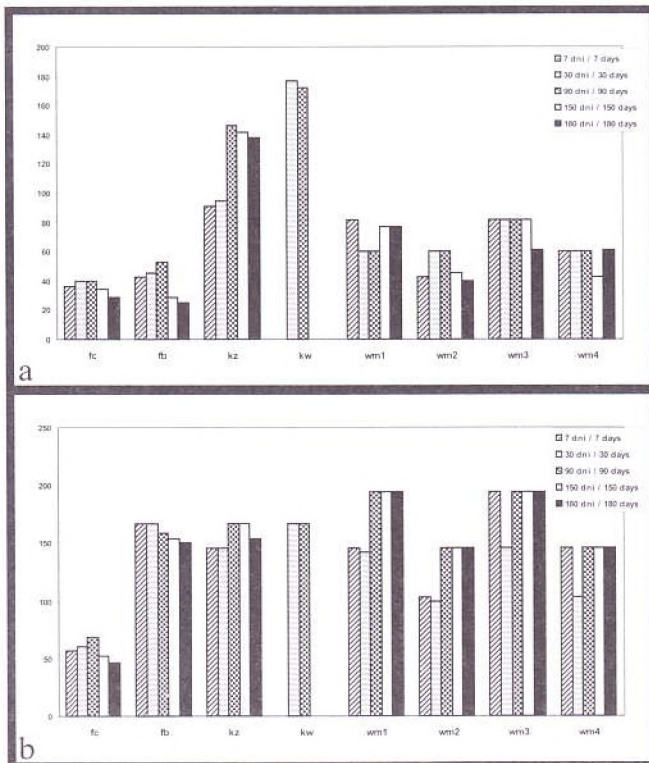
Stwierdzono charakterystyczne zachowanie komórek ziarniny wobec wszczepionych biomateriału. Materiał Sz2 rozpadał się najczęściej w drobne fragmenty, a te były otaczane składowymi macierzy międzykomórkowej. Skład chemiczny powierzchni materiału Sz2 powodował przyłączenie fibrocytów, a więc wstępną "akceptację" tego biomateriału co powodowało silne przyciąganie komórek ziarniny i komórek obronnych.

Reakcje komórek ziarniny na obecność biomateriałów były zależne także od wielkości fragmentów tych materiałów. Małe fragmenty biomateriałów były otaczane przez

enzymes G6PDH and NADDH activity and especially significant decrease of OCC activity. Activity of oxidative enzymes in muscle fibres close to the implant was compared with activity of the enzymes in fibres located further from the implant. Muscle fibres located further were often characterised with higher activity of OCC, NADDH and G6PDH comparing to the fibres located close to the implant. Regenerating muscle fibres, so fibres that were close to the implantation site, in spite of smaller dimensions of their cross-sections, were characterised with the activity of the studied enzymes similar to that of not injured muscle fibres. The tested implanted bio-materials did not suppress regenerating capacities of the skeletal muscle tissue.

A characteristic behaviour of granulation cells towards the implanted bio-material was found. The Sz2 material often disassembled into small fragments that were surrounded with compounds of intracellular matrix. Chemical composition of the surface of Sz2 material caused fibrocyte attachment and this preliminary "acceptance" of the bio-material caused in turn strong attraction of granulation and protective cells.

Granulation cells reactions on the bio-material presence were also dependent on size of the material fragments. Small fragments were surrounded by single fibroblasts and granulation cells or by multi-nuclear cells formed from combined fibroblasts. Larger fragments of the bio-material were surrounded by multiple layers of those cells. In subsequent series formation of a fibrous connective tissue capsule composed of those layers around the bio-material implants was found, but fibroblasts directly adhering to the bio-material did not change and were still performing their phagocytal functions.



RYS. 2. Przeciętna aktywność enzymów (a-NADH, b-G6PDH i c-OCC) utleniających w miejscach wszczepu biomateriału Sz2. Nasilenie aktywności enzymów obliczono w jednostkach gęstości optycznej mierzone metodą densytometryczną.
FIG. 2. Mean value of oxydating enzymes (a-NADH, b-G6PDH and c-OCC) activity in the implant of Sz2 biomaterial area measured in optical density units.

LEGENDA: fc - fibrocyty; fb - fibroblasty; kz - komórki ziarniny; kw - komórki wielojądrowe; wm1 - włókna mięśniowe wąskie we wszczepie; wm2 - włókna mięśniowe szerokie we wszczepie; wm3 - włókna mięśniowe wąskie poza wszczepem; wm4 - włókna mięśniowe szerokie poza wszczepem

LEGENDA: fc - fibrocytes; fb - fibroblasts; kz - cells of granulomatous tissue; kw - multinucleated cells; wm1 - muscular fibers "wąskie" in the implant area; wm2 - muscular fibers "szerokie" in the implant area; wm3 - muscular fibers "wąskie" far from the implant area; wm4 - muscular fibers "szerokie" far from the implant area

Granulation cells showed growing G6PDH activity in implants sites in subsequent series which suggests intensified processes of protein production. Similar G6PDH activity intensification was also characteristic for multi-nuclear cells around the Sz2 implant.

OCC activity in granulation cells of the S2 implant sites was on a lower level comparing to the activity of G6PDH and NADDH. The implanted S2 material induced probably intensification of glycolysis in granulation cells. Comparison between the intensification of those three enzymes activities allows to conclude that activity of enzymes connected

pojedyncze fibroblasty i komórki ziarniny, względnie przez komórki wielojądrowe utworzone z połączenia się fibroblastów. Większe fragmenty biomateriałów były otoczone wieloma warstwami tych komórek. W kolejnych seriach obserwowano wokół miejsc wszczepów biomateriałów powstawanie torebki łącznotkankowej włóknistej złożonej z tych warstw, jednakże bezpośrednio przylegające do biomateriału fibroblasty nie zmieniały się pełniąc nadal funkcje fagocytarne.

Komórki ziarniny wykazywały wzrastającą w kolejnych seriach aktywność G6PDH w miejscach wszczepów Sz2 wskazującą na wzmożone procesy produkcji białek podobnym podwyższeniem aktywności G6PDH cechowały się także komórki wielojądrowe wokół wszczepu Sz2.

Aktywność OCC w komórkach ziarniny miejsc wszczepów Sz2 utrzymywała się na niższym poziomie w porównaniu z aktywnością G6PDH i NADPH. Wszczepiony materiał Sz2 wywołał zapewne w komórkach ziarniny wzrost tempa glikolizy. Z przeprowadzonych porównań między nasileniami aktywności tych trzech enzymów można wnioskować o wzroście aktywności enzymów związanych z NADPDH w tym z cyklem pentozofosforanowym co potwierdza obserwowana aktywność G6PDH.

Wnioski

1. Szybka i intensywne odpowiedź na materiał Sz2 (dużo neutrofilów w serii 2-dniowej, a niska w 7-dniowej) wskazuje na szybką odpowiedź układu odpornościowego.

2. Materiał Sz2 łatwo ulegał rozpadowi na drobne fragmenty, które z kolei ulegały fagocytozie a obszary, w których został zresorbowany powyższy materiał uległ całkowitej lub zaawansowanej naprawie.

3. We wszczepach materiału są, aż do 90 dnia trwania eksperymentu widoczne są duże skupiska makrofagów ze sfagocytowanym materiałem. Proces oczyszczania miejsca wszczepu poprzez fagocytozę trwa długo. Wokół materiału Sz2 po częściowym wygaszeniu napływu mastocytów i eozynofiliów już w 90 dniu, następuje nawrót zwiększonej liczebności tych komórek w serii 180-dniowej związany ze wzmożonym tworzeniem tkanki łącznej włóknistej zawierającej naczynia krwionośne.

4. Obecność biomateriału nie wywołała wyraźnego obniżenia aktywności enzymów utleniających tj. G6PD, NADHD i OCC we włóknach mięśniowych szkieletowych i w tkance łącznej właściwej i włóknistej.

Stwierdzono wysoki stopień regeneracji włókien mięśniowych szkieletowych i tkanki łącznej właściwej i włóknistej. Wyniki badań testowanego biomateriału Sz2 wykazały wysoką biogodność tkankową.

Podziękowania

Badania finansowane przez KBN. Decyzja Nr 1460/P05/2000/19 (4POC049 19).

with NADPDH, including enzymes connected with pentosephosphate cycle, grows and this finding is supported by the observed G6PDH activity.

Conclusions

1. Fast and intense response on the S2 material (large number of neutrophils in the 2-days long series, and low in the 7-days long series) suggests fast reaction of the immune system.

2. S2 material easily disassembled into small fragments which in turn were easily phagocited, and areas where the material underwent resorption were completely or at least largely repaired.

3. Up to the 90th day of the experiment large clusters of macrophages with phagocited material are visible in the implants. The process of implantation site cleaning through phagocytosis takes a long time. Around the S2 material, after partly decrease of mastocytes and eosinophiles inflow on the 90th day, there is a reappearance of elevated numbers of those cells in the 180-days long series. The reappearance is connected with intensified creation of fibrous connective tissue containing blood vessels.

4. Presence of the bio-material did not cause a significant decrease of oxidative enzymes activity, e.g. G6PD, NADHD and OCC in skeletal muscle fibres and in fibrous and proper connective tissue.

High degree of re-generation of muscle fibres and of fibrous and proper connective tissue was found. Results of the S2 bio-material research show high tissue bio-compatibility.

Acknowledgements

This investigations are financial supported by the Polish State Comitee for Scientific Reesearch project No: 1460/P05/2000/19 (4POC049 19).

Piśmiennictwo

References

- [1] Therin M., Christel P., Meunier A.: Analysis of the general features of the soft tissue response to same metals and ceramics using quantitative histomorphometry. *J. Biomed. Mater. Res.* 28(1994) 1267-1276.
- [2] Zamorska L., Błażewicz M., Żolnierek M., Menaszek E., Nowak B.: Histochemical analysis of tissue response in intramuscular implants of carbon fibres. Third Conference "Biomaterials", Ryty (Poland), 6-7 X 1993.
- [3] Zamorska L., Błażewicz M., Żolnierek M., Menaszek E., Nowak B.: Odpowiedź tkankowa na włókniste wszczepy węglowe. *Mat. Kraj. Konf. "Nowe Materiały i Technologie Dla Medycyny"*, Częstochowa-Kokotek, 19-21 VI, 1995, str 199-207.
- [4] Zamorska L., Błażewicz M., Żolnierek M., Menaszek E., Nowak B.: The regeneration process in rat skeletal muscle with implanted carbon biomaterials. *Mat. IV Symp. "Molekularne i fizjologiczne aspekty regulacji ustrojowej"*, Kraków, 6-7 VI 1995, str.370-371.
- [5] Zamorska L., Błażewicz M., Papież M., Żolnierek M., Nowak B.: The regeneration and tissue response to implants of carbon biomaterials in rat skeletal muscle. *Proc. of 7th Internat. Symp. "Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism"*, 1998, 347-349.