ENGINEERING OF BIOMATERIALOW

Journal of Polish Society for Biomaterials and Faculty of Materials Science and Ceramics AGH-UST Czasopismo Polskiego Stowarzyszenia Biomateriałów i Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH

Number 133 Numer 133 Volume XVIII Rok XVIII

OCTOBER 2015 PAŹDZIERNIK 2015

ISSN 1429-7248

PUBLISHER: WYDAWCA:

Polish Society for Biomaterials in Krakow Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie

EDITORIAL COMMITTEE: KOMITET REDAKCYJNY:

Editor-in-Chief Redaktor naczelny Jan Chłopek

Editor Redaktor Elżbieta Pamuła

Secretary of editorial Sekretarz redakcji Design Projekt Katarzyna Trała Augustyn Powroźnik

ADDRESS OF EDITORIAL OFFICE: ADRES REDAKCJI:

AGH-UST 30/A3, Mickiewicz Av. 30-059 Krakow, Poland Akademia Górniczo-Hutnicza al. Mickiewicza 30/A-3 30-059 Kraków

Issue: 250 copies Nakład: 250 egz.

Scientific Publishing House AKAPIT Wydawnictwo Naukowe AKAPIT e-mail: wn@akapit.krakow.pl



BI MATERIALS

EDITORIAL BOARD KOMITET REDAKCYJNY

EDITOR-IN-CHIEF Jan Chłopek - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

EDITOR Elżbieta Pamuła - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland

INTERNATIONAL EDITORIAL BOARD MIĘDZYNARODOWY KOMITET REDAKCYJNY

Iulian Antoniac - University Politehnica of Bucharest, Romania LUCIE Bacakova - Academy of Science of the Czech Republic, Prague, Czech Republic Romuald Będziński - WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLAND Marta Błażewicz - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Stanisław Błażewicz - AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland Maria Borczuch-Łączka - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Wojciech Chrzanowski - UNIVERSITY OF SYDNEY, AUSTRALIA Jan Ryszard Dąbrowski - Białystok Technical University, Poland Timothy Douglas - UNIVERSITY OF GENT, BELGIUM Christine Dupont-Gillain - UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN, BELGIUM Matthias Epple - UNIVERSITY OF DUISBURG-ESSEN, GERMANY Robert Hurt - BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE, USA James Kirkpatrick - JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY, MAINZ, GERMANY Małgorzata Lewandowska-Szumieł - Medical University of Warsaw, Poland Jan Marciniak - Silesian University of Technology, Zabrze, Poland Sergey Mikhalovsky - UNIVERSITY OF BRIGHTON, UNITED KINGDOM Stanisław Mitura - Technical University of Lodz, Poland Roman Pampuch - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Abhay Pandit - National University of Ireland, Galway, Ireland Stanisław Pielka - WROCŁAW MEDICAL UNIVERSITY, POLAND Vehid Salih - UCL EASTMAN DENTAL INSTITUTE, LONDON, UNITED KINGDOM Jacek Składzień - Jagiellonian University, Collegium Medicum, Krakow, Poland Andrei V. Stanishevsky - University of Alabama at Birmingham, USA Anna Ślósarczyk - AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW, POLAND Tadeusz Trzaska - University School of Physical Education, Poznań, Poland Dimitris Tsipas - ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, GREECE

BI MATERIALS

Wskazówki dla autorów

.

1. Prace do opublikowania w kwartalniku "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" przyjmowane będą wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski. Obcokrajowców obowiązuje tylko język angielski.

2. Wszystkie nadsyłane artykuły są recenzowane.

3. Materiały do druku prosimy przysyłać na adres e-mail: kabe@agh.edu.pl.

4. Struktura artykułu:

TYTUŁ • Autorzy i instytucje • Streszczenie (200-250 słów) • Słowa kluczowe • Wprowadzenie • Materiały i metody • Wyniki i dyskusja • Wnioski • Podziękowania • Piśmiennictwo

5. Autorzy przesyłają pełną wersję artykułu, łącznie z ilustracjami, tabelami, podpisami i literaturą w jednym pliku. Ilustracje, tabele, podpisy i literatura powinny być umieszczone również w wersji angielskiej. Artykuł w tej formie przesyłany jest do recenzentów. Dodatkowo autorzy proszeni są o przesłanie materiałów ilustracyjnych (rysunki, schematy, fotografie, wykresy) w oddzielnych plikach (format np. .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Rozdzielczość rysunków min. 300 dpi. Wszystkie rysunki i wykresy powinny być czarno-białe lub w odcieniach szarości i ponumerowane cyframi arabskimi. W tekście należy umieścić odnośniki do rysunków i tabel. W tabelach i na wykresach należy umieścić opisy polskie i angielskie. 6. Na końcu artykułu należy podać wykaz piśmiennictwa

w kolejności cytowania w tekście i kolejno ponumerowany. 7. Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzenia do opracowań autorskich zmian terminologicznych, poprawek redakcyjnych, stylistycznych, w celu dostosowania artykułu do norm przyjętych w naszym czasopiśmie. Zmiany i uzupełnienia merytoryczne będą dokonywane w uzgodnieniu z autorem. 8. Opinia lub uwagi recenzentów będą przekazywane Autorowi do ustosunkowania się. Nie dostarczenie poprawionego artykułu w terminie oznacza rezygnację Autora z publikacji pracy w naszym czasopiśmie.

9. Za publikację artykułów redakcja nie płaci honorarium autorskiego.

10. Adres redakcji:

Czasopismo

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków tel. (48) 12 617 25 03, 12 617 25 61 tel./fax: (48) 12 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Szczegółowe informacje dotyczące przygotowania manuskryptu oraz procedury recenzowania dostępne są na stronie internetowej czasopisma: www.biomat.krakow.pl

Warunki prenumeraty

Zamówienie na prenumeratę prosimy przesyłać na adres: apowroz@agh.edu.pl, tel/fax: (48) 12 617 45 41 Cena pojedynczego numeru wynosi 20 PLN Konto: Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3 ING Bank Śląski S.A. O/Kraków nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Instructions for authors

1. Papers for publication in quarterly journal "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" should be written in English.

2. All articles are reviewed.

3. Manuscripts should be submitted to editorial office by e-mail to kabe@agh.edu.pl.

4. A manuscript should be organized in the following order:

• TITLE • Authors and affiliations • Abstract (200-250 words)

 Keywords (4-6) • Introduction • Materials and Methods • Results and Discussions • Conclusions • Acknowledgements • References

5. All illustrations, figures, tables, graphs etc. preferably in black and white or grey scale should be additionally sent as separate electronic files (format .jpg, .gif., .tiff, .bmp). Highresolution figures are required for publication, at least 300 dpi. All figures must be numbered in the order in which they appear in the paper and captioned below. They should be referenced in the text. The captions of all figures should be submitted on a separate sheet.

6. References should be listed at the end of the article. Number the references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text.

7. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style and to modify the manuscripts to fit in with the style of the journal. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the authors for revision.

8. Opinion or notes of reviewers will be transferred to the author. If the corrected article will not be supplied on time, it means that the author has resigned from publication of work in our journal.

9. Editorial does not pay author honorarium for publication of article.

10. Address of editorial office:

Journal

"Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" AGH University of Science and Technology Faculty of Materials Science and Ceramics 30/A-3, Mickiewicz Av., 30-059 Krakow, Poland tel. (48) 12) 617 25 03, 12 617 25 61 tel./fax: (48) 12 617 45 41 e-mail: chlopek@agh.edu.pl, kabe@agh.edu.pl

Detailed information concerning manuscript preparation and review process are available at the journal's website: www.biomat.krakow.pl

Subscription terms

Subscription rates: Cost of one number: 20 PLN Payment should be made to: Polish Society for Biomaterials 30/A3, Mickiewicz Av. 30-059 Krakow, Poland ING Bank Slaski S.A. account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

25th Conference on BIOMATERIALS IN MEDICINE AND VETERINARY MEDICINE

13-16 October 2016 Hotel "Perła Południa" Rytro, Poland www.biomat.agh.edu.pl



ENGINEERING OF BIOMATERIALS

SPIS TREŚCI

CONTENTS

BIODEGRADABLE CEMENT TYPE BONE IMPLAN MATERIALS BASED ON CALCIUM PHOSPHATES AND CALCIUM SULPHATE Dominika Siek, Joanna Czechowska, Aneta Zima, Anna Ślósarczyk	т 2	BIODEGRADABLE CEMENT TYPE BONE IMPLAN MATERIALS BASED ON CALCIUM PHOSPHATES AND CALCIUM SULPHATE Dominika Siek, Joanna Czechowska, Aneta Zima, Anna Ślósarczyk	т 2
BADANIE DZIAŁANIA ANTYBAKTERYJNEGO KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLI(L-LAKTYDU) PRZEZNACZONYCH NA BIODEGRADOWALNE GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE Patrycja Domalik-Pyzik, Anna Morawska-Chochół, Magdalena Rzewuska, Barbara Szaraniec, Jan Chłopek	7	ANTIBACTERIAL ACTIVITY STUDY OF POLY(L-LACTIDE) COMPOSITES FOR NOVEL BIODEGRADABLE INTRAMEDULLARY NAILS Patrycja Domalik-Pyzik, Anna Morawska-Chochół, Magdalena Rzewuska, Barbara Szaraniec, Jan Chłopek	7
"MOSTOWANIE KRĘGOSŁUPA" – STOP TYTANU A POLIMER PEEK W ZASTOSOWANIU NA MIĘDZYTRZONOWĄ STABILIZACJĘ KRĘGOSŁUPA Lechosław F. Ciupik, Agnieszka Kierzkowska, Jacek Sterna, Jerzy Pieniążek, Monika Cieślik-Górna	14	"BRIDGING OF SPINE" – TITANIUM ALLOY AND POLYMER PEEK FOR INTERVERTEBRAL STABILIZATION OF SPINE Lechosław F. Ciupik, Agnieszka Kierzkowska, Jacek Sterna, Jerzy Pieniążek, Monika Cieślik-Górna	14
CHARAKTERYSTYKA MECHANICZNA WIELOFUNKCYJNEJ RESORBOWALNEJ PŁYTKI KOMPOZYTOWEJ DO ZESPOLEŃ KOSTNYCH Karol Gryń, Barbara Szaraniec, Anna Morawska-Chochół, Jan Chłopek	22	MECHANICAL CHARACTERIZATION OF MULTIFUNCTIONAL RESORBABLE COMPOSITE PLATE FOR OSTEOSYNTHESIS Karol Gryń, Barbara Szaraniec, Anna Morawska-Chochół, Jan Chłopek	22



1

Wersja papierowa czasopisma "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" jest jego wersją pierwotną Printed version of "Engineering of Biomaterials / Inżynieria Biomateriałów" is a primary version of the journal

BIODEGRADABLE CEMENT TYPE BONE IMPLANT MATERIALS BASED ON CALCIUM PHOSPHATES AND CALCIUM SULPHATE

Dominika Siek*, Joanna Czechowska, Aneta Zima, Anna Ślósarczyk

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, 30 MICKIEWICZA AV., 30-059 KRAKOW, POLAND *E-MAIL: SIEK@AGH.EDU.PL

Abstract

Calcium phosphates (CaPs) are widely used in hard tissue replacement because of their excellent biocompatibility. Calcium phosphate cements (CPCs) are an interesting alternative for sintered calcium phosphate ceramics due to their mouldability and self-setting properties which allow them to conform to even the most complex bone defects. However, one of the major limitations of CPCs is their relatively low resorption rate, not optimal for bone regeneration. The aim of our studies was to combine a stable hydroxyapatite with more soluble α -tricalcium phosphate (α -TCP) or calcium sulphate (CS) (resorbability: CS>>α-TCP>HA) to develop biomaterial with gradual degradation. Promising materials for use in minimally invasive surgery for bone defects repair were obtained. It was found that the degradation rate of hydroxyapatite based bone substitutes can be controlled by the addition of an appropriate kind and amount of more soluble constituent. The impact of the setting component (a-TCP or CS) on the physicochemical properties of the final products was confirmed. Furthermore the influence of organic additives (chitosan, methylcellulose, alginate) on the final materials characteristic was proven. Solutions of organic additives, applied as the liquid phases, significantly improved the workability of cement pastes. It has been demonstrated that implant materials based on calcium sulphate and α-TCP differed in their setting times, mechanical strength, dissolution rate and morphologies of apatite layers on their surfaces after soaking in simulated body fluid. The reason of observed differences is a higher susceptibility of calcium sulphate to both disintegration and degradation.

Keywords: calcium phosphate cements, hydroxyapatite, calcium sulphate, α -tricalcium phosphate, biomaterial

[Engineering of Biomaterials 133 (2015) 2-6]

Introduction

Nowadays calcium phosphates based bioceramics (CaPs) attracts a great interest as a material for bone substitution, mainly due to their biocompatibility and bioactivity [1-4]. CaPs sintered biomaterials may be applied in the form of powders, granules, porous and dense blocks. Calcium phosphates may also be used in the form of chemically bonded bioceramics i.e. bone cements. Calcium phosphate cements (CPCs), were invented in 1986 by Brown and Chow [5]. CPCs compose of powder and liquid phases which when mixed together create a shapeable paste. Afterward the paste is placed or injected into the bone cavity, where it sets in situ. Calcium phosphate cements can form hydroxyapatite (HA, $Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$) and/or brushite (CaHPO₄·2H₂O) as the reaction products. Numerous advantages such as biocompatibility, mouldability, self-setting, easy adaptation to geometrically complex shapes of defects and similarity to the bone mineral phase make CPCs an interesting alternative for sintered calcium phosphate ceramics [6,7]. Nevertheless, calcium phosphate cements have also some drawbacks which limit their clinical use. Their disadvantages include: relatively slow resorption rate, lack of macroporosity and poor mechanical properties. During the setting reaction of CPCs, nano- and micropores are formed, however the absence of interconnected macropores is believed to be a limiting factor in achieving resorption that is allied with the apposition of new bone [8-10]. A number of approaches have been applied to obtain macroporous CPCs, including additions of various soluble inorganic and organic compounds, which create the macroporosity [11-13]. Furthermore foaming agents were incorporated in the cement paste to produce synthetic calcium phosphate foams [6]. Creating macropores in the CPCs bodies by incorporation of biodegradable compounds and foaming resulted in an increase in degradation rate [14-18].

In this work a stable hydroxyapatite was combined with more soluble a-tricalcium phosphate or calcium sulphate (resorbability: CS>>a-TCP>HA) to obtain materials with gradual degradation. There are a variety of CaP cement systems and materials composed of a-tricalcium phosphate $(\alpha$ -TCP, Ca₃(PO₄)₂) are especially interesting [19]. One of the advantages of α-TCP is its ability to hydrolyze and set into calcium deficient hydroxyapatite (CDHA) at near physiological conditions from a single solid reactant. Calcium sulfate (CS) is a well-tolerated, biodegradable and osteoconductive bone graft substitute and has been proven to be effective, biocompatible component in CPCs [20,21]. Furthermore it has been reported that CS stimulates the formation of blood vessels, which has been found to be extremely important in bone formation [22,23]. The process of vascular induction is called angiogenesis, and it plays a key role in bone regeneration, because the new bone tissue formation is related to the local presence of blood vessels. Moreover, calcium sulphate based biomaterials possessed the ability to release a broad range of bioactive and therapeutic agents what makes CS an interesting component of composite-type bone cements [24]. It is known that using organic additives in the cement liquid may improve the workability of cement pastes [16].

The aim of the study was to develop and evaluate the new bone substitutes based on calcium phosphates and calcium sulphate as well as investigate the influence of powder and liquid phase composition on physicochemical properties of the final materials.

Materials and Methods

Materials

In this study four materials in the form of mouldable pastes were obtained by mixing powder (P) and liquid (L) phases in appropriate ratios. Liquid to powder ratio (L/P) was experimentally adjusted for each material. Initial powder batches were prepared by combining hydroxyapatite (HA) with α -tricalcium phosphate (α -TCP) or calcium sulphate (CS). HA and α -TCP were synthesized by the wet chemical method. CaO (POCH, Poland) and H₃PO₄ were applied to synthesize HA.



During the synthesis pH value of the slurry was stabilized at ~11 using ammonium hydroxide (POCH, Poland) solution. Hydroxyapatite precipitate was dried and calcined above 700°C (HA/c). Calcium hydroxide Ca(OH)₂ (MERCK, Germany) and 85% phosphoric acid (POCH, Poland) were used to obtain α -TCP. The produced α -TCP powder was sintered at 1300°C, ground in the attritor and sieved [25]. Calcium sulphate hemihydrate (CaSO₄ \cdot 0.5H₂O) was purchased from Acros Organics, USA. A variety of liquids, chosen during the preliminary studies (results not shown) were used in the preparation of cements. Distilled water, 1.00% chitosan solution (ALDRICH, Germany) in 0.30% CH₃COOH (POCH, Poland), 0.75% methylcellulose solution (Fluka) in 2.00% Na₂HPO₄ (CHEMPUR, Poland) and 0.75% alginate solution (Acros Organics, USA) in 2.00% Na₂HPO₄ served as liquid phases. Initial powder and liquid composition of studied cements was presented in TABLE 1.

TABLE 1. Initial composition of studied bonecements.

Cement	Powder phase (P)	Liquid phase (L)	L/P [g/g]		
А	CS : HA/c	distilled water	0.54		
В	3:2	chitosan solution	0.54		
С	α-TCP : HA/c	methylcellulose solution	0.50		
D	3:2	alginate solution	0.50		

Specific surface area

Specific surface area of the initial powders was determined via BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) method.

Phase composition

The phase composition (XRD, Bruker) of starting powders and the final cement bodies was checked by X-ray diffraction (XRD) using D2 PHASER (Bruker) with CuK_a radiation within the 20 range from 10° to 90°. All crystalline phases were identified by comparison with the Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS): HA (JCPDS 01-074-9761), α -TCP (JCPDS 00-009-0348) and calcium sulphate dihydrate (CSD) (JCPDS 00-006-0047). Phase quantification was done using the Rietveld analysis.

Setting times

The initial (I) and final (F) setting times of the cements were measured using the Gillmore needles according to the C266-08 ASTM standard [26]. Results were presented as data mean \pm standard deviation.

Compressive strength

The specimens for compressive strength measurements were prepared by putting cement pastes into a cylindrical Teflon mold (6 mm in diameter and 12 mm in height). The Universal Testing Machine (Instron 3345) was used for measuring the compressive strength of specimens at the loading rate of 1 mm/min. Data were presented as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was done using one-way analysis of variance (ANOVA) and post-hoc Tukey HSD multiple comparison.

Porosity

The open porosity of hardened cement bodies was investigated via the mercury intrusion porosimetry (MIP, Auto Pore IV, Micromeritics).

In vitro chemical stability and bioactivity

In order to estimate a biochemical stability of the cement measurements of pH changes and ionic conductivity in simulated body fluid (SBF) and distilled water, during the samples incubation at 37°C, were conducted. SBF was produced according to Kokubo's procedure [27]. SEM observations of the cement samples surfaces (Nova 200 NanoSEM, FEI Company) as well as analysis of the chemical composition in microareas (EDS) to evaluate the bioactive potential were done. After 7 days of incubation in SBF weight loss (WL) of specimens was calculated as follows:

$WL(\%) = (W_0 - W_1)/W_0 \cdot 100$	(1
	· · ·

where W_0 is the initial weight of the specimen and W_d is the weight of the specimen dried after incubation in SBF [28].

Results and Discussion

Specific surface area

Specific surface area of the starting powders, determined via BET method, was as follows: α -TCP - 3.81 ±0.02 m²/g, calcium sulphate hemihydrate - 1.77 ±0.04 m²/g and HA/c - 24.7 ±0.02 m²/g. The obtained results may suggest the differences in reactivity of the powders during reactions accompanying setting processes.

Phase composition

where

The phase composition of the studied bone cements is shown in TABLE 2. The detailed analysis of the XRD patterns confirmed that calcined hydroxyapatite powder (HA/c) was monophasic hydroxyapatite. The initial α -TCP powder was composed of 94.3 ±3.5 wt.% α -TCP and 5.7 ±3.5 wt.% HA. Calcium sulphate hemihydrate and α -tricalcium phosphate were the setting components in the studied materials. In the case of material A and B higher liquid to powder ratio was established in comparison to cements C and D. Materials A and B after setting and hardening were composed of hydroxyapatite and calcium sulphate dihydrate (CSD) (TABLE 2). Presence of CSD in the final materials was the result of reaction between calcium sulphate hemihydrate and water, according to the equation (2) [29]:

$$2(CaSO_4 \cdot 0.5H_20) + 3H_2O \rightarrow 2(CaSO_4 \cdot 2H_20) + Q \qquad (2)$$

$$(CSH) \rightarrow (CSD)$$

Cements C and D consisted of two crystalline phases: α -TCP and hydroxyapatite (TABLE 2). Observed decrease in the amount of α -TCP in the set cement bodies was a result of α -TCP hydrolysis to a calcium-deficient hydroxyapatite (CDHA), according to the equation (3) [30,31]:

$$\begin{array}{ccc} 3 \alpha - Ca_{3}(PO_{4})_{2} + H_{2}O \rightarrow Ca_{9}(HPO_{4})(PO_{4})_{5}(OH) & (3) \\ \alpha - TCP & \rightarrow & CDHA \end{array}$$

It was concluded that about ~10-15 wt.% of α -TCP hydrolyze to CDHA in cement C and D (TABLE 2).

TABLE 2.	Phase	composition	of	studied	bone
cements 7	days a	fter setting an	d h	ardening	

Comont	Crystalline phases [wt.%]					
Cement	HA	α-TCP	CSD			
А	40.2 ±2.4	-	59.8 ±2.4			
В	39.1 ±2.1	-	60.9 ±2.1			
С	52.9 ±1.7	47.1 ±1.7	-			
D	52.2 ±1.1	47.8 ±1.1	-			

BIC MATERIALS

Setting times

Setting process of cements based on calcium sulphate and HA/c was faster in comparison to materials consisting of α -TCP and HA/c (TABLE 3). Cements A and B set from 3 ±1 (I) to 14 ±1 (F) min, while in the case of materials C and D setting times ranged from 10 ±1 (I) to 30 ±1 (F) min. Materials based on calcium sulphate and distilled water showed the shortest setting times (I = 3 ±1, F = 6 ±1 min). Rapid setting process of material A may cause difficulties with cement preparation and application that is why it was eliminated from further studies. Introduction of the applied organic solution improved the workability of obtained cement pastes via enhancing their flexibility. On the other hand using solution of the chitosan in acetic acid significantly prolonged setting process of materials on the basis of CS and HA/c.

TABLE	3.	Initial	and	final	setting	times	of	the
cements	s.							

Comont	Setting time [min]				
Cement	Initial (I)	Final (F)			
А	3 ±1	6 ±1			
В	7 ±1	14 ±1			
С	10 ±1	30 ±1			
D	11 ±1	27 ±1			

Compressive strength

Cements based on CS and HA/c showed comparable compressive strength (~9 MPa) (one-way ANOVA, P > 0.05). The lowest compressive strength value (2.7 ±0.6 MPa) was observed for material D consisting of α -TCP, HA/c and alginate used in the form of liquid phase (FIG. 1). The compressive strength of developed materials was comparable with cancellous bone (2-12 MPa [32]).



FIG. 1. Compressive strength of the cements 7 days after setting and hardening. Mean \pm standard deviation, samples marked + are statistically different from A and B (one-way ANOVA, p>0.05).

Porosity

Developed cements exhibited the biomodal pore size distributions with pores below 1.4 μ m (A and B) and 0.5 μ m (C and D) (FIG. 2). Macroporosity in CPCs is expected to be formed *in vitro* and *in vivo* via dissolution of soluble setting phases i.e. α -TCP and calcium sulphate dihydrate. Open porosity of final cement bodies was ~49 vol.% (TABLE 4).



FIG. 2. Pore size distribution curves of developed cements.

TABLE 4. Open porosity and pore size distribution of the materials.

Cement	Porosity [vol. %]	Pore size distribution [µm]
А	49	0.017 – 1.400 max I: 0.040 max II: 0.480
В	49	0.017 – 1.400 max I: 0.035 max II: 0.630
С	49	0.012 – 0.320 max I: 0.043 max II: 0.120
D	49	0.012 – 0.470 max I: 0.036 max II: 0.220

Based on obtained results two materials with the most favorable physicochemical properties were chosen for further studies, namely cements B and C. Selected biomaterials exhibited not only easy molding, allowing them to conform precisely to irregular bone voids, but also optimal setting times as well as good compressive strength.



FIG. 3. SEM micrographs and chemical composition in microareas of the cement B: non-incubated (a), after 7 days of incubation in SBF (b) and cement C: non-incubated (c), after 7 days of incubation in SBF (d).







FIG. 5. Ionic conductivity vs. incubation time of samples B and C in distilled water.

In vitro chemical stability and bioactivity

5

In vitro studies revealed that developed materials varied in the morphologies of apatite layers on their surfaces after soaking in SBF (FIG. 3). In the case of cement B, composed of CS and HA/c with chitosan applied in the form of liquid phase, as soon as after 7 days of incubation in simulated body fluid (SBF), surface of tested material was covered with the typical cauliflower-like CaPs structures. Cement B consisted of fast resorbable calcium sulphate which is the rich source of Ca2+. Released calcium ions react with phosphate ions from the SBF and create apatite layer on the surface of incubated samples. It was concluded that cement B, may be regarded as bioactive. In contrast on the surface of cement with α-TCP, HA/c and methylcellulose solution noncontinuous and irregular apatite layer was observed. a-TCP dissolves slower than CSD which may be the reason for the observed differences.

In the case of both examined materials pH during 28 days of incubation in SBF was close to the physiological level (FIG. 4). Higher ionic conductivity observed for cement B was connected with CSD dissolution and thus release of high amounts of calcium and sulphate ions (FIG. 5). Implant materials based on calcium sulphate showed higher degradation rate compared to materials with α -TCP during incubation in SBF. After 7 days of soaking in SBF material B showed 20 ±1.6wt.% weight loss, while the 4 ±0.4 wt.% increase in weight for material C was observed.

It confirmed different degradability and potential *in vivo* biodegradability of the studied cements.

Conclusions

New bioactive and potentially biodegradable materials based on calcined hydroxyapatite and α-tricalcium phosphate or calcium sulphate were developed. The impact of the setting component (a-TCP or CS) on the physicochemical properties of the final products was confirmed. The results of our studies demonstrated that degradation rate of CPCs can be controlled by addition of appropriate amount of more soluble component. Implant materials based on calcium sulphate and HA/c showed higher degradation rate compared to materials with α -TCP and HA/c during incubation in SBF. Obtained potential bone substitutes possessed bimodal pore size distribution and open porosity ~49 vol.%. Solutions of selected organic additives (i.e. chitosan, methylcellulose, alginate), applied as the liquid phases, significantly improved the workability of cement pastes. Cement (B) based on CS and HA/c with chitosan introduced in the form of liquid phase revealed the most favorable properties. It showed good handling, optimal initial and final setting time $(I = 7 \pm 1 \min, F = 14 \pm 1 \min)$ as well as compressive strength of 9.4 ±1.0 MPa. SEM and EDS studies showed the growth of apatite layer on the surface of this material as soon as after 7 days of incubation in SBF what confirmed its bioactive character. Further biological evaluation of developed biomaterials is necessary.

Acknowledgments

6

The work has been supported by the Polish National Science Centre funds allocated with the decision DEC-2013/09/N/ST8/04171.

References

[1] Dorozhkin S.V., Epple M.: Biological and medical significance of calcium phosphates. Angewandte Chemie International Edition 41 (2002) 3130-3146.

[2] Polkowska I., Sobczyńska-Rak A., Szyszkowska A., Koper J., Ślósarczyk A.: Use of hydroxyapatite in the treatment of bone cavities after the removal of inflammatory lesions within the jaws - case reports. Medycyna Weterynaryjna 68[7] (2012) 436-440.

[3] Ślósarczyk A., Piekarczyk J.: Ceramic materials on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. Ceramics International 25[6] (1999) 561-565.

[4] Wójtowicz J., Leszczyńska J., Chróścicka A., Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Zima A., Rożniatowski K., Jeleń P., Lewandowska-Szumieł M.: Comparative in vitro study of calcium phosphate ceramics for their potency as scaffolds for tissue engineering, Bio-Medical Materials and Engineering 24 (2014) 1609-1623.

[5] Brown W.E., Chow L.C.: A new calcium phosphate water setting cement, In Cements Research Progress, Brown P.W., editor, American Ceramic Society: Westerville, OH, USA (1986) 352-379.
[6] Montufar E.B., Traykova T., Gil C., Harr I., Almirall A., Aguirre A., Engel E., Planell J.A., Ginebra M.P.: Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. Acta Biomaterialia 6[3] (2010) 876-885.

[7] Ginebra M.P., Espanol M., Montufar E.B., Pereza R.A., Mestres G.: New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine, Acta Biomaterialia 6[8] (2010) 2863-2873.

[8] Frankenburg E.P., Goldstein S.A., Bauer T.W., Harris S.A., Poser R.D.: Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. The Journal of Bone&Joint Surgery 80[8] (1998) 1112-1124.

[9] Jansen J.A., de Ruijter J.E., Schaeken H.G., van der Waerden J.P.C.M., Planell J.A., Driessens F.C.M.: Evaluation of tricalcium phosphate/hydroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 6 (1995) 653-657.

[10] Ooms E.M., Wolke J.G., van der Waerden J.P., Jansen J.A.: Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca–P) cement. Journal of biomedical materials research 61 (2002) 9-18.
[11] Takagi S., Chow L.C.: Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 12 (2001) 135-139.

[12] Xu H.H.K., Weir M.D., Burguera E.F., Fraser A.M.: Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. Biomaterials 27 (2006) 4279-4287.

[13] Ruhé P.Q., Hedberg E.L., Padron N.T., Spauwen P.H.M., Jansen J.A., Mikos A.G.: Biocompatibility and degradation of poly(dllactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites. Journal of Biomedical Materials Research 74A (2005) 533-544.

[14] Khashaba R., Moussa M.M., Mettenburg D.J., Rueggeberg F.A., Chutkan N.B., Borke J.L.: Polymeric-Calcium Phosphate Cement Composites-Material Properties: In Vitro and In Vivo Investigations. International Journal of Biomaterials (2010).

[15] Moreau J., Xu H.H.K.: Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate - chitosan composite scaffold. Biomaterials 30[14] (2009) 2675-2682. [16] Pere R.A.,, Kim H.W., Ginebra M.P.: Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate, Journal of Tissue Engineering 3[1] (2012) 2041731412439555.

[17] Wang X., Ma J., Wang Y., He B.: Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. Biomaterials 22[16] (2001) 2247-2255.

[18] Zhou W., Xue Y., Ji X., Yin G., Zhang N., Ren Y.: A novel injectable and degradable calcium phosphate/calcium sulfate bone cement. African Journal of Biotechnology 10[88] (2011) 19449-19457.
[19] Czechowska J., Zima A., Paszkiewicz Z., Lis J., Ślósarczyk A.: Physicochemical properties and biomimetic behaviour of α-TCP-chitosan based materials. Ceramics International 40 (2014) 5523-5532.

[20] Zima A., Paszkiewicz Z., Siek D., Czechowska J., Ślósarczyk A.: Study on the new bone cement based on calcium sulfate and Mg, CO_3 doped hydroxyapatite. Ceramics International 38[6] (2012) 4935-4942.

[21] Olkowski R., Kaszczewski P., Czechowska J., Siek D., Pijocha D., Zima A., Ślósarczyk A., Lewandowska-Szumieł M.: Cytocompatibility of the selected calcium phosphate based bone cements: comparative study in human cell culture. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 26[12] (2015) 270.

[22] McNeill S.R., Cobb C.M., Rapley J.W., Glaros A.G., Spencer P.: In vivo comparison of synthetic osseous graft materials: a preliminary study. Journal of Clinical Periodontology 26 (1999) 239-245.
[23] Strocchi R., Orsini G., Iezzi G., Scarano A., Rubini C., Pecora G., Piattelli A.: Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. Journal of Oral Implantology 28[6] (2002) 273-278.

[24] Orellana BR, Hilt J.Z., Puleo D.A.: Drug release from calcium sulfate-based composites. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 103[1] (2014) 135-142.

[25] Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Sposób wytwarzania wysokoreaktywnych proszków fosforanów wapnia, (2005) PL 190 486 [26] ASTM C266-04: Standard test method for time setting of hydraulic-cement paste by gillmore needles, ASTM Annual Book of standards, PA 19428-2959, USA.

[27] Takadama H., Kokubo T.: In vitro evaluation of bioactivity, In: Bioceramics and their clinical applications, Kokubo T., editor, Cambridge UK: Woodhead Publishing (2008) 165-183.

[28] Xue Z., Zhang H., Jin A., Ye J., Ren L., Ao J., Feng W., Lan X.: Correlation between degradation and compressive strength of an injectable macroporous calcium phosphate cement. Journal of Alloys and Compounds 520 (2012) 220-225.

[29] Singh N.B., Middendorf B.: Calcium sulphate hemihydrate hydration leading to gypsum crystallization. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials 53[1] (2007) 57-77.

[30] Camiré C.L., Gbureck U., Hirsiger W., Bohner M.: Correlating crystallinity and reactivity in an α -tricalcium phosphate. Biomaterials 26[16] (2005) 2787-2794.

[31] Durucan C., Brown P.W.: α-Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 11[6] (2000) 365-371.
[32] Bartolo PJ.: Virtual and Rapid Manufacturing: Advanced Research in Virtual and Rapid, Taylor&Francis Group, London (2007) 64.

•••••

BADANIE DZIAŁANIA ANTYBAKTERYJNEGO KOMPOZYTÓW NA BAZIE POLI(L-LAKTYDU) PRZEZNACZO-NYCH NA BIODEGRADOWALNE GWOŹDZIE ŚRÓDSZPIKOWE

Patrycja Domalik-Pyzik^{1*}, Anna Morawska-Chochół¹, Magdalena Rzewuska², Barbara Szaraniec¹, Jan Chłopek¹

 ¹ AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów,
 al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
 ² Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Nauk Przedklinicznych,
 ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa
 *E-mail: pdomalik@agh.edu.pl

Streszczenie

Implantacja gwoździ śródszpikowych wiąże się z ryzykiem wystąpienia poważnej infekcji kości spowodowanej zakażeniem bakteryjnym. Tradycyjna antybiotykoterapia w tym przypadku ma wiele ograniczeń. Rozwiązaniem tego problemu może być lokalne dostarczanie leku bezpośrednio do miejsca implantacji. Jednym ze sposobów na realizację takiego rozwiązania jest stosowanie pokryć tradycyjnych gwoździ metalowych pokrytych degradowalnym materiałem polimerowym pozwalającym na kontrolowane uwalnianie substancji leczniczej. Autorzy poszli o krok dalej proponując wytworzenie nowatorskich gwoździ śródszpikowych z materiału degradowalnego, któremu nadano właściwości antybakteryjne poprzez wprowadzenie do resorbowalnej matrycy polimerowej antybiotyku w postaci siarczanu gentamycyny (GS). Dodatkowo osnowę z poli(L-laktydu) (PLA) zmodyfikowano wprowadzając druty ze stopów magnezu (MG), włókna węglowe (CF), włókna alginianowe (ALG) oraz nanocząstki fosforanu trójwapnia (TCP) w różnych układach. Test aktywności antybakteryjnej przeprowadzono z użyciem szczepu metycilino-wrażliwego Staphylococcus pseudintermedius. Dokonano analizy ilościowej i jakościowej stref zahamowania wzrostu bakterii utworzonych wokół badanych fragmentów gwoździ. Wykazano, że wszystkie zaproponowane materiały kompozytowe z dodatkiem gentamycyny wykazują działanie hamujące wzrost i namnażanie bakterii, najsilniejsze w przypadku układów PLA/CF/ ALG/GS oraz PLA/CF/ALG/TCP/GS. Działanie to utrzymuje się nawet po 12 dniach od pierwszego wysiewu. Ponadto badania wykazały, że gwóźdź PLA/MG również wykazuje słabe oddziaływanie antybakteryjne pomimo braku dodatku w postaci antybiotyku, jednak działanie to zostaje zablokowane po wprowadzeniu TCP do matrycy polimerowej.

Słowa kluczowe: działanie antybakteryjne, biodegradowalne kompozyty, implanty dla ortopedii, polilaktyd

[Inżynieria Biomateriałów 133 (2015) 7-13]

ANTIBACTERIAL ACTIVITY STUDY OF POLY(L-LACTIDE) COMPOSITES FOR NOVEL BIODEGRADABLE INTRAMEDULLARY NAILS

Patrycja Domalik-Pyzik^{1*}, Anna Morawska-Chochół¹, Magdalena Rzewuska², Barbara Szaraniec¹, Jan Chłopek¹

¹ AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. A. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND ² WARSAW UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES - SGGW, FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, DEPARTMENT OF PRECLINICAL SCIENCES, UL. CISZEWSKIEGO 8, 02-786 WARSZAWA, POLAND *E-MAIL: PDOMALIK@AGH.EDU.PL

Abstract

Intramedullary nails implantation carries a risk of a serious bone infection caused by bacteria. In this case traditional antibiotic therapy has many limitations. A good solution to the problem can be local drug delivery directly to the implantation site. One of the ways to implement such solution is to use, on the surface of traditional metallic nails, degradable polymer coatings that enable controlled drug release. Authors went a step further by proposing to fabricate novel intramedullary nails entirely from degradable material that has been endowed with antibacterial properties. Antibacterial protection was provided by the introduction of an antibiotic - gentamicin sulphate (GS) to the poly(L-lactide) (PLA) matrix. Into the resorbable matrix the following modifying phases were also introduced: magnesium alloy wires (MG), carbon fibers (CF), alginate fibers (ALG) and tricalcium phosphate nanoparticles (TCP), in various systems. Antibacterial activity test was carried out using methicillin-sensitive strain Staphylococcus pseudintermedius. Qualitative and quantitative analysis of bacteria growth inhibition zones formed around studied nails' samples were performed. It has been proven that all of the proposed composite materials with gentamicin addition showed inhibitory effect on growth and proliferation of bacteria, with the strongest in the case of PLA/CF/ALG/GS and PLA/CF/ALG/TCP/GS systems. The inhibitory effect was maintained even after 12 days since the first inoculation. Moreover, the study proved that PLA/MG nails also showed some antibacterial activity, despite lack of the antibiotic addition. However, after introduction of TCP to the matrix, this action has been blocked.

Keywords: antibacterial activity, biodegradable composites, orthopaedic implants, polylactide

[Engineering of Biomaterials 133 (2015) 7-13]

8

Operacja wszczepienia implantu zapewniającego śródszpikową stabilizację złamania kości wiąże się z narażeniem pacjenta na ryzyko zakażenia bakteryjnego na skutek przerwania ciągłości tkanek. Mimo zachowania wszelkich zasad aseptyki i sterylności sali zabiegowej częstym powikłaniem w przypadku implantacji gwoździ śródszpikowych jest zapalenie istoty zbitej kości i szpiku (ang. *osteomyelitis*), będące groźną w skutkach infekcją kości wywoływaną najczęściej przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* [1,2].

Standardową praktyką stosowaną w celu zapobiegania pooperacyjnym zakażeniom bakteryjnym jest odpowiednia antybiotykoterapia [3]. Jednak ogólnosystemowe dostarczanie antybiotyków w przypadku walki z infekcjami związanymi z umieszczeniem w kanale kostnym implantu wiąże się z dodatkowymi trudnościami wynikającymi ze specyfiki miejsca i urazu. Pierwszym problemem jest to, że antybiotyki podane systemowo mogą nie dotrzeć do kanału kości długiej ze względu na zaburzenie przepływu krwi związane z urazem lub też z samym zabiegiem gwoździowania śródszpikowego. Co więcej pojawia się ryzyko utworzenia się biofilmu przez bakterie kolonizujące powierzchnię implantu. Biofilm będący strukturą polisacharydową chroni bakterie przed działaniem antybiotyku. Dlatego też, leczenie infekcji wymaga w tym przypadku agresywnego działania, a więc wiąże się z koniecznością powtórnej operacji - usunięcia zaimplantowanego gwoździa śródszpikowego oraz stosowania długotrwałej antybiotykoterapii. Istotnie wydłuża to czas powrotu pacjenta to zdrowia i znacznie podnosi koszty terapii [4-6].

Odpowiedzią na wady i niedostatki systemowej antybiotykoterapii jest lokalna administracja leku na granicy implant-tkanka [6,7]. Znanym rozwiazaniem sa kapsułki wykonane z polimetakrylanu metylu (PMMA) będące nośnikiem gentamycyny, lecz i one wymagają usunięcia po około 4-6 tygodniach od implantacji. Inną propozycją są biodegradowalne pokrycia polimerowe (najczęściej z poli--laktydu) modyfikowane odpowiednim antybiotykiem [4,6]. Zapewniają one możliwość kontrolowanego uwalniania leku bezpośrednio w miejscu wprowadzenia implantu. Jednak trzeba pamiętać, że antybakteryjne, degradowalne pokrycia są stosowane na powierzchniach tradycyjnych, metalowych gwoździ śródszpikowych [8]. Gwoździe te, po spełnieniu swojej funkcji związanej ze stabilizacją złamania do czasu wytworzenia zrostu kostnego, muszą zostać usunięte z kanału szpikowego kości pacjenta.

Lokalne dozowanie leku wiąże się z różnorakimi wymogami. Jest to między innymi konieczność zapewnienia właściwej kinetyki uwalniania leku związanej z zapewnieniem odpowiednich jego dawek w funkcji czasu. Bardzo istotne jest także to, by na całej powierzchni kontaktu tkanka--implant antybiotyk był rozprowadzany równomiernie [7,9].

W tej perspektywie autorzy zaproponowali nowatorskie rozwiązanie w postaci wielofazowych i wielofunkcyjnych, degradowalnych gwoździ śródszpikowych. W poprzednich pracach [10,12] omówiono właściwości zaprojektowanych kompozytów pod kątem spełniania funkcji mechanicznych, biologicznych, itp. Celem niniejszych badań była odpowiedź na pytanie czy odpowiednia modyfikacja analizowanych układów kompozytowych umożliwi spełnienie funkcji czynnika zapobiegającego rozwojowi infekcji. W związku z tym przeprowadzono test aktywności antybakteryjnej i dokonano oceny ilościowej i jakościowej uzyskanych wyników. Oceniono wpływ zastosowanych modyfikatorów na wielkość i równomierność stref hamowania wzrostu bakterii.

Introduction

Implantation of a device that should ensure intramedullary stabilization of a bone fracture involves also exposure of a patient to the risk of bacterial infection due to disruption of tissues. In spite of preservation of all aseptic techniques and sterility of operating room, osteomyelitis - dangerous bone infection caused mainly by *Staphylococcus* bacteria - is still a common complication of intramedullary nails implantation [1,2].

A standard prevention practice in the case of postoperative bacterial infection is an appropriate antibiotic therapy [3]. However, systemic administration of antibiotics for fighting infections associated with the placement of the implant in the bone canal is connected to additional difficulties resulting from specificity of local conditions and trauma. The first difficulty is that antibiotics administrated systemically might not reach the canal of a long bone due to blood flow disorder associated with injury or implantation of the intramedullary nailing. Moreover, there is a risk of the formation of biofilm by the bacteria colonizing the surface of the implant. Biofilm is a polysaccharide structure which protects the bacteria against the antibiotics. Therefore, the treatment of the infection in this case requires aggressive action and thus requires reoperation - the removal of implanted intramedullary nail and long-term antibiotic therapy. This significantly increases the patient's recovery time and the treatment cost [4-6].

The answer to the flaws and shortcomings of the systemic antibiotic therapy is the local drug administration on the implant-tissue interface [6,7]. Known solution are beads made of polymethyl methacrylate (PMMA), being gentamicin carriers, but they also need to be removed after approximately 4-6 weeks since implantation. Biodegradable polymer coatings (usually from polylactide) modified with the appropriate antibiotic are another solution [4,6]. They ensure controlled release of the drug directly to the implantation site. However, it has to be remembered that the antibacterial, degradable coatings are applied to the surface of traditional metal intramedullary nails [8]. These nails, after fulfilling their function associated with the stabilization of the fracture until the bone union, are being removed from the patient's bone medullary canal.

There are various requirements associated with the local drug administration. Among other things, it is a necessity to provide adequate drug release kinetics and thus provide appropriate drug doses as a function of time. It is also important that antibiotic is uniformly distributed on the whole tissue - implant contact surface [7,9].

In this perspective, Authors proposed an innovative solution in the form of multiphase and multi-functional, degradable intramedullary nails. In previous papers [10-12], properties of the designed composites were discussed paying special attention to the fulfilment of mechanical and biological functions, etc.

The aim of the study was to answer the question whether appropriate modification of the analyzed composite systems will allow them to prevent infection development. Therefore, there was antibacterial activity test performed as well as quantitative and qualitative analysis of obtained results. Influence of the applied modifiers on the size and uniformity of the bacteria growth inhibition zones was evaluated.

Materiały i metody

Materiały

Materiały użyte do wytworzenia próbek kompozytowych: PLA - poli(L-laktyd) (IngeoTM 3051D) - NatureWorks® LLC, USA:

MG - druty ze stopów magnezu - Leibniz Universität Hann--over, Niemcy [12];

TCP - β-fosforan trójwapnia (54,3% mas. CaO, 45,7% mas. P_2O_5) - Sigma-Aldrich;

CF - włókna węglowe (HTS 5631) - Toho Tenax America; ALG - włókna z alginianu wapnia - Katedra Materiałoznawstwa Towaroznawstwa i Metrologii Włókienniczej, Wydział Technologii Materiałowych i Wzornictwa Tekstyliów, Politechnika Łódzka;

GS - siarczan gentamycyny - Interforum Pharma Sp. z o.o. Kraków.

Próbki

Analizie poddano następujące układy kompozytowe:

K1 - PLA/GS K6 - PLA/CF/ALG K2 - PLA/MG K7 - PLA/CF/ALG/GS K3 - PLA/MG/GS K8 - PLA/CF/ALG/TCP K4 - PLA/MG/TCP K5 - PLA/MG/TCP/GS

K9 - PLA/CF/ALG/TCP/GS

Próbki K1-K5 otrzymywano metodą wtrysku na wtryskarce ślimakowej firmy Multiplas, natomiast próbki K6-K9 formowano z roztworu. Dokładną procedurę opisano w pracach [11,12].

Test aktywności antybakteryjnej w warunkach in vitro

Gwoździe kompozytowe K1-K9 przycięto do trzech długości: 4, 8 i 12 mm. Następnie umieszczono je na sterylnych szalkach Petriego - najkrótsze fragmenty (4 mm) prostopadle do powierzchni szalki, pozostałe równo--legle. Dla każdego materiału użyto od 2 do 8 fragmentów. Do każdej szalki nalano medium hodowlane Mueller-Hinton Agar (BioMérieux, Francja) z dodatkiem szczepu metycylino-wrażliwego Staphylococcus pseudintermedius (MSSP, 376/11): 0,01 ml zawiesiny bakterii (o gęstości 6 w skali McFarlanda) na 25 ml medium. Całość inkubowano w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych przez 48 h. Po tym czasie szalki Petriego wyjęto i wykonano dokumentację fotograficzną. Próbki przechowywano w lodówce przez 8 dni, następnie wykonano powtórną inokulację (powierzchniową) na powierzchni pożywki tym samym szczepem gronkowca i inkubację trwającą 48 h w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych. Wykonano analize ilościowa i jakościowa widocznych na zdjęciach stref zahamowania wzrostu bakterii powstałych wokół badanych fragmentów gwoździ.

Analizę ilościową przeprowadzono przy pomocy programu do przetwarzania i analizy obrazów ImageJ. Dla każdej strefy wykonano po trzy pomiary pola powierzchni (A - ang. area) i obwodu (P - ang. perimeter). Obliczono wartości współczynnika kształtu (y - ang. circularity) i współczynnika wydłużenia (A_R - ang. aspect ratio), a także wartości średnie i odchylenie standardowe dla wszystkich parametrów. Współczynnik kształtu (inaczej kołowość) to miara podobieństwa kształtu figury do koła (dla koła ma wartość 1):

$$\gamma = \frac{P^2}{4\pi A}$$

Miarą wydłużenia figury jest z kolei stosunek najdłuższego R_{max} do najkrótszego R_{min} promienia poprowadzonego ze środka ciężkości figury:

$$A_{R} = \frac{R_{max}}{R_{min}}$$

Obie te wielkości posłużyły do opisu regularności obserwowanych stref zahamowania wzrostu.

.

Materials and Methods

Materials

Materials used in this study for samples' fabrication: PLA - poly(L-lactide) (IngeoTM 3051D) - NatureWorks® LLC, USA;

MG - magnesium alloy wires (two diameters and different alloy contents) - Leibniz Universität Hannover, Germany [12]; TCP - β-tricalcium phosphate powder (54.3 mass % CaO, 45.7 mass % P₂O₅) - Sigma-Aldrich;

CF - carbon fibers (HTS 5631) - Toho Tenax America;

ALG - calcium alginate fibers -Department of Material and Commodity Sciences and Textile Metrology, Faculty of Material Technologies and Textile Design, Technical University of Lodz, Poland;

GS - gentamicin sulfate - Interforum Pharma Sp. z o.o. Krakow, Poland.

Samples

Different composites were tested:

K1 - PLA/GS K2 - PLA/MG K3 - PLA/MG/GS K4 - PLA/MG/TCP

K6 - PLA/CF/ALG K7 - PLA/CF/ALG/GS K8 - PLA/CF/ALG/TCP K9 - PLA/CF/ALG/TCP/GS K5 - PLA/MG/TCP/GS

Samples K1-K5 were fabricated by injection molding using Multiplas company's injection molder, while samples K6-K9 were fabricated from solution. The detailed procedure was described in the previous papers [11,12].

In vitro antibacterial activity assay

The composite nails K1-K9 for testing were cut to three lengths: 4, 8 and 12 mm. They were then placed on sterile Petri dishes: the shortest fragments (4 mm) perpendicularly to the surface of the dish, the rest in parallel. There were 2 to 8 fragments of each material. The Mueller-Hinton Agar medium (BioMérieux, France) with the addition of methicillinsensitive strain Staphylococcus pseudintermedius (MSSP, 376/11): 0.01 ml bacteria suspension (density 6 according to McFarland) per 25 ml of medium, was poured to each dish. The whole was incubated at 37°C under aerobic conditions for 48 h. After this time, the Petri dishes were removed and photographic documentation was done. The samples were stored in the refrigerator for 8 days, then on the surface of the medium another inoculation was performed with the same strain of Staphylococcus. After that, they were again incubated for 48 h at 37°C under aerobic conditions. Quantitative and qualitative analysis of bacterial growth inhibition zones formed around studied fragments of the nails were performed.

Qualitative analysis was performed with the image processing and analyzing software ImageJ. For each inhibition zone measurements of area (A) and perimeter (P) were done in triplicates. Circularity (γ) and aspect ratio (A_{R}), as well as mean values and standard deviations were calculated. Circularity (roundness) defines how closely the shape of an object approaches that of a circle (it is 1 for circle):

$$r = \frac{P^2}{4\pi A}$$

The measurement of geometric figure's elongation is the ratio of the longest R_{max} to the shortest R_{min} radius drew from the figure's center of gravity:

$$A_{\rm R} = \frac{R_{\rm max}}{R_{\rm min}}$$

Both of these values were used to describe the regularities of observed inhibition zones.

W TABELI 1 zebrano wyniki pomiarów parametrów geometrycznych stref zahamowania wzrostu bakterii obserwowanych dla poszczególnych materiałów kompozytowych z rozróżnieniem na próbki ułożone prostopadle i równolegle do powierzchni szalki. Analiza wielkości pól powierzchni stref zahamowania uformowanych wokół poszczególnych próbek pozwala stwierdzić, że wszystkie gwoździe mające dodatek antybiotyku wykazują aktywność antybakteryjną, co wskazuje na prawidłowe uwalnianie substancji czynnej z matrycy polilaktydowej. Największe strefy zahamowania wzrostu bakterii występują wokół próbek wykonanych z materiałów modyfikowanych fazami włóknistymi (włóknami węglowymi i włóknami z alginianu wapnia). Dodatki włókniste wprowadzone do osnowy zwiększają powierzchnię granic międzyfazowych, ułatwiają penetrację płynu do wnętrza gwoździ i tym samym wymywanie antybiotyku z objętości materiałów. Wpływ stosowanych modyfikatorów na kinetykę uwalniania leku został przedstawiony w poprzedniej pracy autorów [12].

Results and Discussions

Results of geometric parameters measurements of the bacteria growth inhibition zones observed for each composite material with a distinction on samples placed perpendicularly and in parallel to the Petri dish surface are presented in TABLE 1. Analysis of the inhibition zone areas formed around each sample allows to state that all the nails with antibiotic addition exhibit antibacterial activity. This indicates correct drug release from polylactide matrix. The largest bacteria growth inhibition zones were formed around samples made of materials modified with fibrous phases (carbon and calcium alginate fibers). Fibrous modifiers introduced into matrix increase interface boundaries area, what facilitates penetration of a liquid inside the nails and in the same way drug removal from the volume of the material. Influence of the used modifiers on the drug release kinetics was presented in author's previous paper [12].

TABELA 1. Zestawienie parametrów geometrycznych dla stref zahamowania wzrostu bakterii różnie ułożonych próbek: A - pole powierzchni, γ - współczynnik kształtu (kołowość), A_R - współczynnik wydłużenia (po 48 h inkubacji).

TABLE 1. Comparison of the geometric parameters for bacteria growth inhibition zones of differently positioned samples: A - surface area, γ - circularity, A_R - aspect ratio (after 48 h incubation).

	Dráblica	Ułożenie próbki / Sample position						
No	PIODKa	prostopadłe / perpendicular			rów	równoległe / horizontal		
	Campic	A [mm ²]	γ	A _R	A [mm ²]	γ	A _R	
K1	PLA/GS	440 (39)	1.00 (0.00)	1.05 (0.03)	996 (354)	1.24 (0.07)	1.46 (0.19)	
K2	PLA/MG	197 (18)	1.00 (0.00)	1.03 (0.02)	212 (61)	1.14 (0.04)	1.41 (0.21)	
K3	PLA/MG/GS	521 (24)	1.01 (0.02)	1.06 (0.04)	1197 (465)	1.11 (0.04)	1.06 (0.04)	
K4	PLA/MG/TCP	11.8 (0.8)	1.00 (0.00)	1.07 (0.02)	brak stref / no inhibition zones		n zones	
K5	PLA/MG/TCP/GS	410 (41)	1.00 (0.00)	1.06 (0.05)	1109 (46)	1.35 (0.09)	1.58 (0.20)	
K6	PLA/CF/ALG	brak stref / no inhibition zones			brak str	ef / no inhibition	n zones	
K7	PLA/CF/ALG/GS	1098 (307)	1.15 (0.05)	1.21 (0.09)	1482 (648)	1.16 (0.05)	1.05 (0.03)	
K8	PLA/CF/ALG/TCP	bra	ik danych / no d	ata	1186 (130) 1.21 (0.08) 1.33 (0.		1.33 (0.09)	
K9	PLA/CF/ALG/TCP/GS	1058 (27)	1.17 (0.02)	1.28 (0.07)	1476 (98)	1.22 (0.15)	1.29 (0.01)	

W przypadku próbek K7 (PLA/CF/ALG/GS) ułożonych prostopadle do powierzchni szalki zwraca uwagę duża nieregularność w wyglądzie stref zahamowania wzrostu uformowanych wokół gwoździ oraz wynikająca z niej znaczna wartość błędu pomiaru i podwyższenie wartości współczynnika kształtu γ i współczynnika wydłużenia A_R. Związane jest to z odsłonięciem rdzenia wykonanego z włókien alginianowych (RYS. 1). Cechą charakterystyczną tych włókien jest silna zdolność do pęcznienia [13], która przyczynia się do zwiększenia stopnia penetracji płynu do wnętrza próbki, co z kolei przyspiesza wypłukiwanie leku z matrycy polimerowej.

Zarówno w zestawieniu tabelarycznym, jak i na RYS. 1 można zauważyć, że kompozyt oznaczony jako K2 (PLA/MG) pomimo braku antybiotyku w jego składzie także wykazuje właściwości hamujące rozwój bakterii, chociaż o mniejszym stopniu. Również porównując gwoździe K1 (PLA/GS) i K3 (PLA/MG/GS) różniące się jedynie obecnością fazy wzmacniającej w postaci dwóch splecionych drutów ze stopów magnezu, widać wyraźnie większe pole powierzchni stref zahamowania wokół gwoździa K3. Związane jest to z aktywnością antybakteryjną samych drutów ze stopów magnezu. Robinson *et al.* [14] podaje, że mechanizm działania anty--bakteryjnego magnezu wiąże się ze wzrostem lokalnych wartości pH na skutek degradacji tego metalu. Autorzy, zmiany wartości pH związane z degradacją tego typu gwoździ przedstawili we wcześniejszych badaniach [11]. In the case of K7 samples (PLA/CF/ALG/GS) placed perpendicularly to the dish surface, large irregularity in the inhibition zones character and substantial values of standard deviations resulting from it, together with increase in circularity γ and aspect ratio AR stand out. It is related to exposure of alginate fibers core (FIG. 1). Strong swelling ability is a characteristic feature of those fibers [13], that facilitates fluid penetration inside the sample and then accelerates drug removal from the polymer matrix.

Both in TABLE 1 and in FIG. 1, it can be noticed that composite K2 (PLA/MG), despite the lack of antibiotic addition, also demonstrates the ability to inhibit bacteria growth, however in the limited range. Additionally, comparison of the K1 (PLA/GS) and K3 (PLA/MG/GS) nails which differ only in term of the applied reinforcement - two interwoven magnesium alloy wires, clearly shows that larger inhibition zone area was formed around the K3 nail. It is particularly related to antibacterial activity of the magnesium alloy wires. Robinson *et al.* [14] reports that mechanism of the magnesium antibacterial activity is associated with local increase in pH values due to the metal degradation. Authors have shown changes in pH values caused by degradation of the designed nails in previous studies [11].



RYS.1. Wygląd stref zahamowania wzrostu dla próbek ułożonych prostopadle (a) i równolegle (b) do powierzchni szalki (po 48 h inkubacji).

FIG.1. Appearance of the bacteria growth inhibition zones for samples positioned perpendicularly (a) and horizontally (b) to the dish surface (after 48 h incubation).

Porównanie pól powierzchni stref hamowania wzrostu bakterii wokół gwoździ wzmacnianych drutami ze stopu magnezu, lecz bez dodatku antybiotyku (gwoździe K2 i K4) wskazuje na wpływ TCP na ich aktywność antybakteryjną. Powierzchnia tych pól w ułożeniu prostopadłym wynosi odpowiednio 197±18 mm² dla próbek PLA/MG (K2) oraz 11,8±0,8 mm² dla próbek PLA/MG/TCP (K4). Podobny wpływ TCP obserwuje się dla gwoździ zawierających siarczan gentamycyny (K3 i K5, ułożenie prostopadłe). Można wnioskować, że wprowadzenie do matrycy polimerowej fosforanu trójwapnia obniża aktywność antybakteryjną drutów magnezowych. Prawdopodobnie ma to związek z faktem, że wzrost pH (odpowiedzialny za działanie antybakteryjne w przypadku MG) nie jest tak znaczący w przypadku próbek modyfikowanych dodatkowo ceramiką [12].

Comparison of the area of bacteria growth inhibition zones formed around the nails reinforced with magnesium alloy wires but without any antibiotic addition (K2 and K4 nails), indicates that the TCP has some influence on their antibacterial activity. In perpendicular placement, the area of the inhibition zones amounts to 197±18 mm² and 11.8±0.8 mm² for the PLA/MG (K2) and PLA/MG/TCP (K4) samples, respectively. Similar TCP effect is visible in the case of the nails containing gentamicin sulfate (K3 and K5, perpendicular placement). It can be deduced that introduction of the tricalcium phosphate to the polymer matrix, reduces antibacterial activity of the magnesium alloy wires. Presumably, it is related to the fact that the pH increase (responsible for antibacterial performance of MG) is not that large in the case of samples that have been additionally modified with ceramic particles [12].

Mechanizm takiego oddziaływania może polegać na tworzeniu fosforanów magnezu i tym samym zmniejszaniu ilości MgOH powstającego przy rozpuszczaniu drutów [14,15]. Poprzednie badania autorów nie wykazały wpływu TCP na uwalnianie gentamycyny, co wyklucza możliwość osłabienia działania antybakteryjnego w wyniku jego interakcji z antybiotykiem [12]. W przypadku gwoździ z modyfikatorami włóknistymi (K7 i K9) wpływ TCP na działanie antybakteryjne nie jest zauważalny.

Analizując wygląd stref zahamowania wzrostu bakterii (RYS. 1) różnie ułożonych próbek zwraca uwage ich nieregularność w przypadku gwoździ ułożonych równolegle do powierzchni szalki. Również porównanie parametrów geometrycznych (TABELA1) próbek ułożonych prostopadle i równolegle do powierzchni szalki wskazuje na różnice w uwalnianiu leku z wnętrza gwoździ i z ich powierzchni. Próbki ułożone równolegle charakteryzują się wyższymi wartościami współczynnika kształtu (niemal równy 1 dla próbek K1 - K5 ułożonych prostopadle; w zakresie 1,11-1,35 dla tych ułożonych równolegle) i współczynnika wydłużenia (ułożenie prostopadłe: 1,03-1,28; równoległe: 1,06-1,58). Nawet uwzględniając fakt, że próbki umieszczone równolegle do powierzchni szalki były około dwukrotnie większe od tych ułożonych prostopadle, można stwierdzić, że strefy zahamowania wzrostu bakterii są większe w przypadku gwoździ ułożonych równolegle. Wskazuje to na szybsze uwalnianie leku z przekrojów gwoździ odsłaniających granice międzyfazowe, niż z powierzchni. Potwierdza to znaczącą rolę granic w procesie dyfuzji i uwalniania leku. Jednocześnie wskazuje na skuteczność impregnacji stosowanych faz modyfikujących oraz rolę osnowy PLA w zabezpieczaniu przed zbyt gwałtownym uwolnieniem leku. W przypadku gwoździ K7 (PLA/CF/ALG/GS) migracja leku z końców gwoździ jest intensywniejsza niż dla K3 (PLA/MG/GS). Wskazuje na to wyższy współczynnik kształtu. Jak już wspomniano wcześniej, może to mieć związek z szybszym uwalnianiem leku z rdzenia z włóknami alginianowymi, ze względu na ich silną zdolność do pęcznienia i wymiany płynów [13]. W przypadku prostopadłego ułożenia gwoździ, czyli w sytuacji gdy rdzeń z włóknami alginianowymi jest osłonięty przez fazy PLA/CF, strefy zahamowania wzrostu są regularne i znacznie mniejsze, co potwierdza wyciągnięte wnioski.

Regularność stref hamowania obserwowano dla wszystkich badanych typów gwoździ ułożonych prostopadle. Jest to szczególnie istotne, gdyż świadczy o równomiernym Formation of magnesium phosphates and as a consequence reduction of the amount of MgOH created during wires dissolution [14,15] can be responsible for such an interaction. Author's previous studies did not show any influence of the TCP addition on the gentamicin release, what eliminates possibility of lessening of antibacterial performance due to its interaction with the antibiotic [12]. In the case of the nails with fibrous modifiers (K7 and K9) there was no noticeable TCP impact on the antibacterial activity.

Analysis of the character of the bacteria growth inhibition zones (FIG. 1) of differently placed samples showed substantial irregularity in the case of the nails placed in parallel to the Petri dish surface. Also comparison of the geometric parameters (TABLE 1) of the samples placed perpendicularly and in parallel to the dish surface points to differences in drug release from inner and outer parts of the nails. Samples placed in parallel have higher values of circularity (almost 1 for K1-K5 samples placed perpendicularly; in the range of 1.11-1.35 for those placed in parallel) and aspect ratio (perpendicular alignment: 1.03-1.28; parallel: 1.06-1.58). Even considering the fact that the samples placed in parallel to the dish surface were almost twice as big as those placed perpendicularly, one can still state that the bacteria growth inhibition zones are bigger for the nails placed in parallel. It suggests faster release of the drug from the ends of the nails that expose interface, than from the surface. It confirms substantial role of the phase boundaries in diffusion and drug release mechanism. At the same time, it points to necessity of proper impregnation of modifying phases and to importance of the PLA matrix in protection against rapid drug release.

In the case of the K7 nails (PLA/CF/ALG/GS) migration of the drug from the ends of the nails is larger than for K3 nails (PLA/MG/GS). It is suggested by higher circularity values. As it was mentioned earlier, it can be related to faster drug release from alginate fibers core connected with their strong swelling and fluid exchange ability [13]. When the nails were placed perpendicularly and the alginate core was protected by the PLA/CF phase, bacteria growth inhibition zones were regular and significantly smaller, what confirms earlier conclusions.

Regularity of the inhibition zones was visible for all nails placed perpendicularly. This is particularly important, because it gives evidence of uniform drug release when the matrix is unimpaired.

kich badanych typów gwoździ u to szczególnie istotne, gdyż s uwalnianiu leku w sytuacji, gdy osnowa jest szczelna (brak przecięć/uszkodzeń).

Dalsze badania wykazały (TABELA 2), że gwoździe kompozytowe modyfikowane gentamycyną utrzymują swoje działanie antybakteryjne nawet po 12 dniach od pierwszego posiewu. Również gwóźdź K2 wzmacniany drutami ze stopów magnezu zachował swoją niewielką zdolność do hamowania wzrostu bakterii po tym okresie czasu. Powinno to zapewnić bardziej długofalową ochronę przed rozwojem infekcji bakteryjnej w miejscu implantacji gwoździa śródszpikowego.

TABELA 2. Pola powierzchni stref zahamowania wzrostu bakterii po pierwszym badaniu (po 48 h) i po drugim (po 12 dniach).

TABLE 2. Surface areas of the bacteria growth inhibition zones after the first test (after 48 h) and after the second one (after 12 days).

No	Próbka	Pole powierzchni Surface area [mm²]			
	Sample	po 48 h	po 12 dniach		
		after 48 h	after 12 days		
K2	PLA/MG	197 (18)	177 (21)		
K3	PLA/MG/GS	521 (24)	515 (53)		
K4	PLA/MG/TCP	11.8 (0.8)	8.1 (0.9)		
K5	PLA/MG/TCP/GS	410 (41)	464 (18)		
K6	PLA/CF/ALG	brak stref / no inhibition zones			
K7	PLA/CF/ALG/GS	1098 (307)	1101 (277)		

Further studies have shown (TABLE 2) that the composite nails modified with gentamicin maintained their antibacterial performance even after 12 days since the first inoculation. Also the K2 nails reinforced with magnesium alloy wires retained their slight ability to suppress bacterial growth. It should assure more long-term protection against bacterial infection development at the intramedullary nail implantation site.

Wnioski

Opracowane materiały kompozytowe modyfikowane siarczanem gentamycyny wykazują działanie antybakteryjne nawet po 12 dniach od pierwszego posiewu. Jest ono uzależnione od rodzaju faz modyfikujących wprowadzonych do kompozytu. W przypadku prostopadłego ułożenia gwoździ mierzone strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów były regularne, co świadczy o równomiernym uwalnianiu leku. Wykazano także, że wprowadzenie do matrycy polimerowej samych drutów ze stopu magnezu ma działanie hamujące wzrost bakterii. Zauważono, że działanie antybakteryjne wynikające z obecności drutów magnezowych jest wyraźnie blokowane przez dodatek TCP, co zdaniem autorów wymaga dalszych badań.

Podsumowując, tego typu wielofazowe, degradowalne kompozyty dzięki uzyskaniu dodatkowo właściwości antyseptycznych stanowią bardzo obiecujące, wielofunkcyjne rozwiązanie materiałowe na gwoździe śródszpikowe.

Podziękowania

Prace były finansowane ze środków statutowych Nr 11.11.160.616 Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, AGH w Krakowie.

Pismiennictwo

[1] S. Rabin, et al. Immune Response to Implants. J.H. Calhoun (Ed.). Medscape 2012.

[2] J. Ciampolini, K.G. Harding: Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? Postgrad. Med. J. 76, 898 (2000) 479-483.

[3] A. Trampuz, W. Zimmerli: Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. Injury 37, 2 (2006) S59-66.
[4] M. Baro, E. Sánchez, A. Delgado, A. Perera, C. Evora: In vitro-in vivo characterization of gentamicin bone implants. J. Control. Release 83, 3 (2002) 353-364.

[5] M.Y. Krasko, J. Golenser, A. Nyska, M. Nyska, Y.S. Brin, A.J. Domb: Gentamicin extended release from an injectable polymeric implant. J. Control. Release 117, 1 (2007) 90-96.

[6] E. Sánchez, M. Baro, I. Soriano, A. Perera, C. Evora: In vivoin vitro study of biodegradable and osteointegrable gentamicin bone implants. Eur. J. Pharm. Biopharm. 52, 2 (2001) 151-158.

[7] M. Lucke, B. Wildemann, S. Sadoni, C. Surke, R. Schiller, A. Stemberger, M. Raschke, N.P. Haas, G. Schmidmaier: Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant--related osteomyelitis in a rat model. Bone 36, 5 (2005) 770-778.
[8] M. Lucke, G. Schmidmaier, S. Sadoni, B. Wildemann, R. Schiller, N. Haas, M. Raschke: Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. Bone 32, 5 (2003) 521-531.
[9] A.K. Dash, G.C. Cudworth: Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 40, 1 (1998) 1-12.

Conclusions

Designed composite materials modified with gentamicin sulfate exhibited antibacterial activity even after 12 days since the first bacteria inoculation. The composite's antibacterial activity depended on the type of modifying phases. In the case of perpendicularly placed nails, bacteria growth inhibition zones were regular, what indicates even drug release. It has also been shown that the introduction into the polymer matrix magnesium alloy wires alone inhibits bacteria growth. Authors have however noticed that antibacterial activity caused by the presence of magnesium alloy wires is largely blocked by addition of TCP - further studies have to be done.

In conclusion, such biodegradable multiphase composites enhanced with antiseptic properties should be considered as a promising multifunctional material solution for intramedullary nails.

Acknowledgments

This research was financed by the statutory research No 11.11.160.616 of Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH University of Science and Technology, Krakow, Poland.

References

[10] A. Morawska-Chochół, J. Chłopek, P. Domalik, M. Boguń: New composite materials based on polylactide matrix for intramedullary nails. Eng. Biomater. 106-108 (2011) 99-104.

[11]A. Morawska-Chochół, J. Chłopek, P. Domalik-Pyzik, B. Szaraniec, E. Grzyśka: Magnesium alloy wires as reinforcement in composite intramedullary nails. Biomed. Mater. Eng. 24, 2 (2014) 1507-1515.
[12] A. Morawska-Chochół, P. Domalik-Pyzik, J. Chłopek, B. Szaraniec, J. Sterna, M. Rzewuska, M. Boguń, R. Kucharski, P. Mielczarek: Gentamicin release from biodegradable poly-l-lactide based composites for novel intramedullary nails. Mater. Sci. Eng. C 45 (2014) 15-20.

[13] Y. Qin: Gel swelling properties of alginate fibers. J. Appl. Polym. Sci. 91, 3 (2004) 1641-1645.

[14] D.A. Robinson, R.W. Griffith, D. Shechtman, R.B. Evans, M.G. Conzemius: In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. Acta Biomater. 6,5 (2010) 1869-1877.

[15] F. Tamimi, D. Le Nihouannen, D.C. Bassett, S. Ibasco, U. Gbureck, J. Knowles, A. Wright, A. Flynn, S.V. Komarova, J.E. Barralet: Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions. Acta biomater. 7, 6 (2011) 2678-2685.

.

14

ш 🎦

"MOSTOWANIE KRĘGOSŁUPA" – STOP TYTANU A POLIMER PEEK W ZASTOSOWANIU NA MIĘDZYTRZO-NOWĄ STABILIZACJĘ KRĘGOSŁUPA

Lechosław F. Ciupik^{1*}, Agnieszka Kierzkowska¹, Jacek Sterna², Jerzy Pieniążek³, Monika Cieślik-Górna⁴

¹ LFC MEDICAL, UL. KOŻUCHOWSKA 41, 65-364 ZIELONA GÓRA
 ² KATEDRA CHORÓB MAŁYCH ZWIERZĄT Z KLINIKĄ, SGGW,
 ³ WOJEWÓDZKI SZPITAL SPECJALISTYCZNY NR 4 W BYTOMIU,
 ⁴ LEGINÓW 10, 41-902 BYTOM
 ⁴ IBEMT INSTYTUT BIOINŻYNIERII I MEDYCZNYCH TECHNOLOGII,
 ⁴ UL. MUCHY 2, 66-016 CZERWIEŃSK
 *E-MAIL: LFC@LFC.COM.PL

Streszczenie

W implantologii kręgosłupowej stosowane są dwa typy implantów: "non-fusion" oraz "fusion", czyli odpowiednio bez zrostu i ze zrostem kostnym. Większą grupę stanowią stabilizacje ze zrostem kostnym, dla których szybkość oraz jakość osteointegracji ma kluczowe znaczenie dla końcowego efektu leczenia. Najczęściej stosowanymi biomateriałami są stopy tytanu oraz polimer PEEK (polieteroeteroketon) o różnej topografii powierzchni 2D oraz przestrzennej konstrukcji 3D wynikających z zastosowanej obróbki wykańczającej, warstw powierzchniowych, metod wytwarzania. Wykazano, że osteointegracja zależy w dużym stopniu od m.in. odpowiedniej konfiguracji 2D i 3D, topografii, porowatości oraz energii powierzchniowej. W pracy przeanalizowano wpływ rodzaju biomateriału: stop Ti6Al4V ELI, PEEK Optima oraz technologii wytwarzania implantów: ubytkowa (PEEK, Ti), przyrostowa EBT - Electron Beam Technology (Ti-3D-Truss) na osteointegrację. Z zachowaniem analogicznych warunków procesu, jak przy produkcji implantów, przygotowano modele/próbki, które poddano badaniom biologicznym in vitro oraz in vivo na zwierzętach. Pobrane preparaty zwierzęce z modelami implantów oceniano pod kątem osteointegracji z użyciem przemysłowej tomografii rentgenowskiej CTt. Wyniki potwierdziły biokompatybilność badanych biomateriałów, a tym samym bezpieczeństwo stosowania w chirurgii kostnej. Implantowe stopy Ti6Al4V ELI w porównaniu z polimerem PEEK są korzystniejszymi biomateriałami na stabilizację międzytrzonową typu "fusion". Polimer PEEK Optima jest dobrym materiałem w stabilizacjach typu "non-fusion". Wykorzystanie technologii przyrostowej EBT do wytwarzania implantów z proszków Ti6AI4V ELI pozwala na uzyskanie "wulkanicznych" powierzchni oraz przestrzennych/kratownicowych konstrukcji Ti-3D-Truss o dużym rozwinięciu powierzchniowym, które sprzyjają i przyspieszają przerost/obrost tkanki kostnej przez implant. Dotvchczasowe doniesienia kliniczne wskazuja na poprawę efektywności chirurgicznego leczenia. polegającego na przyspieszonym zroście kostnym w "mostowaniu" kręgosłupa z wykorzystaniem implantów międzytrzonowych typu Ti-3D-Truss.

Słowa kluczowe: stabilizacja kręgosłupowa, osteointegracja, implant Ti-3D-Truss

[Inżynieria Biomateriałów 133 (2015) 14-21]

"BRIDGING OF SPINE" – TITANIUM ALLOY AND POLYMER PEEK FOR INTERVERTEBRAL STABILIZATION OF SPINE

Lechosław F. Ciupik^{1*}, Agnieszka Kierzkowska¹, Jacek Sterna², Jerzy Pieniążek³, Monika Cieślik-Górna⁴

¹ LFC MEDICAL, R&D, UL. KOŻUCHOWSKA 41,
 65-364 ZIELONA GORA, POLAND
 ² DEPARTMENT OF SMALL ANIMAL DISEASES WITH CLINIC, SGGW,
 UL. NOWOURSYNOWSKA 166, 02-787 WARSAW, POLAND
 ³ REGIONAL SPECIALISED HOSPITAL NO. 4 IN BYTOM,
 AL. LEGIONOW 10 41-902 BYTOM, POLAND
 ⁴ IBEMT INSTITUTE OF BIOENGEENERING AND MEDICAL
 TECHNOLOGIES, UL. MUCHY 2, 66-016 CZERWIENSK, POLAND
 *E-MAIL: LFC@LFC.COM.PL

Abstract

In spinal implantology there are two types of implants: "non-fusion" and "fusion", that is without and with bone overgrowth, respectively. A larger group consists of stabilization with bone overgrowth, for which speed and quality of osseointegration is crucial for final treatment outcome. The most commonly used biomaterials are titanium alloys and polietero--eteroketon (PEEK) of different 2D surface topography and 3D spatial structure resulting from the finishing, surface layers or production methods. It has been shown that osseointegration depends largely on suitable configuration of 2D and 3D, topography, porosity and surface energy. The impact of biomaterial type: Ti6AI4V titanium alloy ELI, PEEK OPTIMA and implant production technology: deficient (PEEK, Ti), incremental EBT-Electron Beam Technology (Ti-3D-Truss) on the osseointegration were analyzed. In compliance with corresponding process conditions of implant production, models/samples were prepared and subjected to in vitro biological tests and in vivo animal tests. Collected animal specimens with implants models were tested for osseointegration with the use of CTt tomography. The results confirmed the biocompatibility of tested biomaterials, and thus safety in the bone surgery. Ti6Al4V ELI alloys compared with PEEK polymer are favourable biomaterials for "fusion" interbody stabilization. The polymer PEEK Optima is preferred material for "non-fusion" stabilizations. The use of EBT technology for implant production made of Ti6Al4V ELI powder allows to obtain "volcanic" surfaces and spatial/lattice Ti-3D-Truss structures with a large surface area which accelerate the bone over-/in-growth through the implant. Previous reports indicate improved clinical effectiveness of surgical treatment involving the accelerated bone overgrowth in the "bridging" of spine with the use of Ti-3D-Truss interbody implants.

Keywords: spinal stabilization, osseointegration, Ti-3D-Truss implant

[Engineering of Biomaterials 133 (2015) 14-21]

Wprowadzenie

W implantologii kręgosłupowej stosowane są dwa typy implantów: "non-fusion" oraz "fusion", odpowiednio: bez i ze zrostem kostnym. Większą grupę stanowią stabilizacje "fusion" o lokalizacji międzytrzonowej. Głównym ich zadaniem jest chirurgiczne uwolnienie od bólu wywołanego głównie zmianami degeneracyjnymi kości i utrzymanie stabilnego biomechanicznie dystansu między elementami kostnymi. Pooperacyjny, ostateczny efekt leczenia zależy od szybkości i jakości osteointegracji implantu z kością i przejęciu funkcji nośnych przez "biologię" [1]. Trwałe łączenie sąsiednich trzonów poprzez budowanie bloków bio-stabilizatora kostnego wzmocnionych biomateriałem nazwano "mostowaniem kręgosłupa" (opr. LfC, 2012) [2,3].

W implantologii kręgosłupowej najczęściej stosowanymi biomateriałami wciąż są polimery PEEK oraz stopy tytanu ze swoimi przewagami oraz ograniczeniami [1,4]. Rozwój inżynierii biomateriałów jest głównie kierunkowany na poprawę odpowiedzi kostnej na biomateriał i procesy wsparcia biomechanicznego z osteointegracją. Udowodniono, że struktury o wysokim stopniu porowatości posiadają lepszą zdolność stymulacji wzrostu, różnicowania osteoblastów [4,5]. Powierzchnie poddawane są funkcjonalnemu uszlachetnianiu poprzez np. utlenianie, implantację jonową, czy stosowanie pokryć hydroksyapatytowych [6-8]. Dużym osiągnięciem było wprowadzenie technologii addytywnych, umożliwiających tworzenie rusztowań i materiałów porowatych [9-13].

Nowoczesne technologie drukowania implantów wymagają szczególnych warunków pro-chirurgicznej "czystości", które zostały opanowane na poziomie ryzyka akceptowalnego. Wciąż trwają prace badawcze nad opracowaniem technologii dla biomateriałów polimerowych, możliwej do użycia w produkcji implantów klasy II b według Dyrektywy Rady Wspólnot Europejskich 2007/47/WE. Technologie przyrostowe wykorzystują głównie selektywne laserowe spiekanie SLS (Selective Laser Sintering) lub selektywne topienie laserowe SLM (Selective Laser Melting) proszków metali. Dla stopów tytanu stosowane jest stapianie proszku stopów tytanu wiązką elektronów EBT (Electron Beam Technology), w Polsce po raz pierwszy wdrożone do produkcji implantów kratownicowych przez LfC w 2011 roku [14]. Szacuje się, że w roku 2015 około 50% wyrobów medycznych z całego asortymentu implantów kręgosłupowych firmy zostało wykonane technologia EBT.

Technologia EBT rozszerza możliwości projektowania i budowania korzystnych konfiguracji implantów *"fusion*" o skomplikowanych kształtach i unikatowych cechach (RYS. 1): - "2D" – uzyskiwana jest "wulkaniczna" rozwinięta powierzchnia o odpowiedniej topografii, chropowatości oraz obniżonej energii powierzchniowej stanowiąca sprzyjające podłoże do kontaktu z komórkami kostnymi;

 - "3D"-Truss – uzyskiwane są przestrzenne konstrukcje stanowiące rusztowania dla wzrostu kości.

Celem pracy jest ocena wpływu rodzaju biomateriału (metalowy, polimerowy) implantu kręgosłupowego oraz jego konfiguracji 2D i 3D, wynikającej z zastosowanej technologii produkcji na ważną dla "bio-stabilizacji" osteointegrację z kością oraz biozgodność tkankową. Badania prowadzono na modelach implantów ze stopu Ti6Al4V ELI. Wyniki odniesiono do modeli ze znanego biomateriału polimerowego PEEK Optima.

Introduction

In the spinal implantology two types of implants: "nonfusion" and "fusion", respectively without and with bone overgrowth are used. A larger group is consisted of "fusion" stabilization with intervertebral location. Their main objective is the surgical release of pain mainly caused by degenerative bone changes and maintenance a biomechanically stable distance between bone elements. Postoperatively, the ultimate effect of the treatment depends on the speed and quality of bone-implant osseointegration and taking over the supporting function by "biology" [1]. Permanent combining of adjacent vertebral bodies through the building of biostabilizer bone blocks reinforced by biomaterial is called "bridging of spine" (dev. LfC, 2012) [2,3].

In the spinal implantology the most commonly used biomaterials are still PEEK polymers and titanium alloys with their advantages and limitations [1,4]. The expansion of biomaterials engineering is mainly directed to provide improved bone response on the biomaterial and processes of biomechanical support with osseointegration. It has been proven that the structure with a high porosity has better ability to stimulate the growth, differentiation of the osteoblasts [4,5]. Surfaces are subjected to functional refining for example: oxidation, ion implantation or the use of hydroxyapatite coatings [6-8]. A major achievement was the introduction of additive technology, enabling the creation of scaffold and porous structures [9-13].

Modern implant printing technologies require specific conditions of pro-surgical "purity" which were mastered at an acceptable risk level. Research is still ongoing to develop technologies for polymeric biomaterials, possible for use in the Class IIb implant manufacturing according to European Community Council Directive 2007/47/EC. Incremental technologies primarily use selective laser sintering SLS (*Selective Laser Sintering*) or selective laser melting SLM (*Selective Laser Melting*) of metal powders. For titanium alloys a Ti alloys powder with electron beam melting EBT (*Electron Beam Technology*) is used, in Poland for the first time truss implant were introduced to production by LfC company in 2011 [14]. It is estimated that in 2015 about 50% of medical products of the entire range of company's spinal implants has been made with EBT technology.

EBT technology extends the capabilities of designing and building a favourable configuration of the "fusion" implants of complex shapes and unique features (FIG. 1):

- "2D" - "volcanic", developed surface with appropriate topography, roughness and reduced surface energy forming favorable substrate for contact with the bone cells is obtained;

- "3D" - Truss - spatial scaffolds for bone growth are obtained.

The aim of the study is to assess the impact of type of spinal implant biomaterial (metal, polymer) and its 2D and 3D configuration, resulting from the production technique, on osseointegration with bone and tissue biocompatibility important for the biostabilization. Tests were carried out on Ti6Al4V ELI alloy implant models. The results were related to the well-known models from PEEK Optima polymer biomaterial.

16



RYS. 1. Implant międzytrzonowy CarRLIF™ (LfC[®]) wykonany technologią przyrostową konstrukcyjnie dostosowany do kręgosłupa z częścią wzmocnioną-litą do przenoszenia obciążeń oraz częścią ażurową wspomagającą przerost/obrost kostny (a); "wulkaniczna" powierzchnia powstała w wyniku stapiania proszków Ti wiązką elektronów - EBT (c) tworząca przestrzenne kratownice 3D (b).

FIG. 1. Intervertebral implant CarRLIF[™] (LfC[®]) made with the use of incremental technology, structurally adapted to spine with reinforced-solid part for load transfer and openwork part promoting bone overgrowth (a); "volcanic surface" as a result of melting of Ti powder with electron beam - EBT (c) constituting spatial trusses 3D (b).

Materiały i metody

Przedmiotem badań były biomateriały, najczęściej stosowne w implantologii kręgosłupowej: polimer PEEK Optima oraz stop Ti6Al4V ELI (Extra Low Interstitial). Próbki/modele do badań wykonano obróbką ubytkową (ozn. PEEK, Ti) oraz dla stopu tytanu technologią EBT, selektywnego spiekania proszków wiązką elektronów (ozn. Ti-3D-Truss/Ti-3D-T). Warunki procesów były analogiczne, jak przy produkcji wszczepiennych wyrobów medycznych w postaci implantów kręgosłupowych. Podatność na osteointegrację kostną oceniano na podstawie badań *in vitro* cytotoksyczności i genotoksyczności oraz badań *in vitro* na zwierzętach.

Testy biologiczne przeprowadzono z zastosowaniem hodowli komórek ludzkiego kostniakomięsaka Saos-2. Sterylne próbki materiałowe inkubowano przez 48 h w zawiesinie z komórkami z medium wzrostowym w temperaturze 37°C. Kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane bez biomateriałów. Kontrolę pozytywną komórki hodowane w odpowiednim medium zawierającym: 1% Triton X-100 przy cytotoksyczności i miocynę C przy genotoksyczności. Cytotoksyczność oceniano na podstawie proc. średniej żywotności komórek, genotoksyczność na podstawie uszkodzeń chromosomów charakteryzowanych liczbą mikrojąder przypadających na 100 komórek dwujądrzastych. Prace zrealizowano w ramach współpracy z ŁRPN-T w Łodzi.

Materiałem badawczym były kozy. Z powodu braku odpowiedniej przestrzeni kostnej w kręgomoście zwierzęcym, eksperyment przeprowadzono wykorzystując dostosowane do anatomii kratownicowe Ti-3D-T modele implantów CarRLIF. Zachowano odpowiedniość do rzeczywistego implantu w zakresie m.in.:

- parametrów wewnętrznej kratownicy;
- grubości implantu, poprzez który ma nastąpić przerost kostny;
- sposobu kotwiczenia w kości fragmenty gwintu wcinające się w kość odpowiadające geometrii płóz prowadzących. Eksperyment realizowano na podstawie pozwolenia Komisji Etycznej oraz według obowiązujących standardów, w tym standardów dotyczących czystości i sterylności. Ocenę post mortem wykonywano po ok. 4 i 6 miesiącach od wszczepienia modeli implantów - after follow-up. Pośmiertną ocenę przerostów kostnych – osteointegracji oceniano na podstawie badań rentgenowskich CTt (tomograf dwulampowy GE: 240 kV, 320 W; 180 kV, 15 W, co daje pełny zakres detekcji w skali Housfielda oraz 16-bitowy detektor o rozdzielczości 1024x1024).

Materials and Methods

The subject of the study were biomaterials most often used in spinal implantology: PEEK Optima polymer and Ti6Al4V ELI (Extra Low Interstitial) alloy. Samples/models for studies were made with the use of subtractive manufacturing (marked PEEK, Ti) and for titanium alloy with EBT technology, selective sintering of powders with electron beam (marked Ti-3D-Truss/Ti-3D-T). Applied production conditions were the same as for the production of implantable medical devices, spinal implants. Susceptibility for bone osseointegration on the basis of cytotoxicity and genotoxicity *in vitro* studies and *in vivo* studies on animals was evaluated.

Biological studies with the use of Saos-2 human osteosarcoma cell cultures were performed. Sterile samples were incubated for 48 h in a suspension of cells in growth medium at 37°C. The negative control consisted of cells cultured without biomaterials. For the assessment of the cytotoxicity the positive control were cells cultured in medium containing 1% Triton X-100, but when assessing the genotoxicity cells incubated with mitomycin C. Cytotoxicity was evaluated on the basis of percent of cells viability. To evaluate the genotoxicity micro nucleus test was used for determining chromosomal damage characterized with the number of micronuclei per 100 binucleated cells. The studies were carried out in cooperation with LRPN-T in Lodz.

The studies were performed on the goats. Due to lack of proper bone space in animal spine, the research was carried out with the use of Ti-3D-T truss structure models of CarRLIF implants adjusted to goat anatomy. Conformity to the real implant was maintained in terms of i.a.:

- parameters of internal truss structure;
- thickness of the implant exposed to bone overgrowth;
- type of anchoring in the bone fragments of thread cutting into the bone corresponding to the geometry of guiding skids.

The research was carried out under the authorization of the Ethics Committee and in accordance with applicable standards, including standards for cleanliness and sterility. The post mortem evaluation was performed after 4 and 6 months after implantation of implant models – after follow-up.

Post mortem bone overgrowth – osseointegration was evaluated on the base of computed tomography CTt testing (dual-lamp tomograph GE: 240 kV, 320 W; 180 kV, 15 W, which enables full range of detection in Housfield scale and 16-bit detector of 1024x1024 resolution).

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań cytotoksyczności dla czterech powtórzeń eksperymentu dla obu typów próbek z Ti6Al4V ELI wykazały ich korzystne oddziaływanie na osteoblasty RYS. 2a. Zanotowano zwiększoną populację żywych komórek na badanych biomateriałach w porównaniu do próby kontrolnej o co najmniej 10%. Dla próbek wykonanych technologią ubytkową (Ti) średnia żywotność wyniosła 112.4 ±2.6%, dla próbek wykonanych technologią przyrostową (Ti-3D-T) 109.6 ±1,0%, natomiast dla polimeru była najmniejsza i wyniosła 105.0 ±1.6%. Genotoksyczność implantowego stopu tytanu Ti6Al4V ELI, charakteryzowana proc. liczbą mikrojąder, kształtowała się na poziomie 8.2 ±1.5 dla Ti, 9.5 ±1.1 dla Ti-3D-T i 9.1 ±0.8 dla PEEK - RYS. 2b. W każdym przypadku była korzystnie niższa od prowadzonej równolegle próby kontrolnej.

Results and Discussions

The results of the cytotoxicity for four replicates of the experiment for both types of Ti6Al4V ELI samples showed their beneficial effects on osteoblasts FIG. 2A. An increase of population of viable cells on the test biomaterials compared to the control sample by at least 10% is reported. For samples made by traditional technology (Ti), the average lifespan was 112.4 ±2.6%, for samples made with incremental technology (Ti-3D-T) was 109.6 ±1.0% while for the polymer samples was the lowest and amounted to 105.0 ±1.6%. Genotoxicity of Ti6Al4V ELI titanium alloy implant characterized by percent of the number of micronuclei stood at 8.2 ±1.5 for Ti, 9.5 ±1.1 for the Ti-3D-T and 9.1 ±0.8 for PEEK - FIG. 2b. In each case, genotoxicity was preferably lower than for the parallel control sample.





Analizy CTt wykazały dobrą osteointegrację dla modeli Ti-3D-T. "Wulkaniczna" struktura 2D oraz przestrzenna kratownica 3D implantów wykonanych technologią przyrostową EBT sprzyjały w pierwszej fazie przerostom, a następnie obrostom kostnym w relatywnie krótkim czasie prowadzonych obserwacji po 4 i 6 miesiącach (M). Zarówno po 4 i 6 M stwierdzono w obrazach CTt wypełnienie kością wewnetrznej, kratownicowej struktury modelu Ti-3D-T w ponad 95% oraz obrost kości wokół powierzchni implantu nie będącej po wszczepieniu w bezpośrednim kontakcie z kością (RYS. 3). Kość była widoczna na CTt w różnych przekrojach przez implant (RYS. 4), co stanowi pożądany element stabilizacji "fusion". Zupełnie inaczej zachowywał się biomateriał PEEK Optima, izolujący się od otaczających tkanek żywych poprzez wytworzenie przypowierzchniowej międzywarstwy biomateriał-tkanka (RYS. 5). W przeciwieństwie do próbki ze stopu tytanu, osadzenie próbki polimerowej w kości było luźne. Przyleganie tkanek do powierzchni polimeru bez osteointegracji świadczy o jego korzystnych własnościach na implanty "non-fusion".

Użyte w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* biomateriały: Ti6Al4V ELI oraz PEEK Optima wykazały dobrą biozgodność. Najkorzystniejszymi własnościami pod kątem osteointegracji charakteryzował się stop tytanu. Wskazywało na to między innymi: największa liczba żywych komórek w badaniach biologicznych, obrosty i przerosty przez modele implantowe obserwowane w CTt oraz stabilne utwierdzenie próbek w tkance kostnej, wykazane podczas badań makroskopowych *post mortem*.

CTt analysis showed good osseointegration for Ti-3D-T models. "Volcanic" 2D structure and 3D spatial lattice of implants made by incremental EBT favored in the first phase of ingrowth, and then bone overgrowth in a relatively short period of observations after 4 and 6 months (M). After 4 and 6 M of implantation over 95% of bone filling in the internal lattice structure of Ti-3D-T model was observed on CTt scans and also overgrowth of the bone around the implant surface, which was not in direct contact with bone after implantation (FIG. 3). The bone was visible on CTt in different sections of the implant (FIG. 4), which is a desirable element of "fusion" stabilization. Quite different was the behavior of biomaterial PEEK Optima, which isolated from surrounding living tissues by producing interlayer on the biomaterial-tissue surface (FIG. 5). In contrary to titanium alloy sample, the seating of polymer sample in the bone was loose. Tissue adhesion to the polymer surface without osseointegration is a beneficial property for a "non-fusion" implants.

Ti6Al4V ELI and PEEK Optima materials used in *in vitro* and *in vivo* studies showed good biocompatibility. Titanium alloy was characterized by the most preferred properties for osseointegration. It was showed by, among others: the largest number of living cells in biological studies, ingrowth and overgrowth through implant models observed in CTt and stable establishing of samples in the bone tissue, shown during macroscopic *post mortem* tests.



RYS. 3. CTt biostabilizacji (a) z obrostem kostnym implantu chirurgicznie w ok. 80% osadzonego w kości (b) z celowo uwypukloną kratownicą Ti-3D-Truss modelu poprzez miejscowe "usunięcie" kości z użyciem funkcji oprogramowania inżynierskiego (c); obszary ciemne – biomateriał, jasne – tkanka kostna. FIG. 3. CTt of biostabilization (a) with bone overgrowth of implant at approximately 80% embedded in the bone (b) deliberately emphasized Ti-3D-Truss by local "removal" of bone with the usage of engineering software function (c); dark area - biomaterial, clear - bone tissue.



RYS. 4. Faza instalowania modelu implantu Ti-3D-Truss w kości kozy (a); CTt post mortem implantu osadzonego w kości (b) oraz powiększony, wyodrębniony z preparatu zwierzęcego fragment implant-kość, wskazujący w przekrojach poprzecznych na pełen przerost kostny; obszary ciemne – biomateriał, jasne – tkanka kostna. FIG. 4. Installation phase of Ti-3D-Truss implant model in goat bone (a); post mortem CTt of implant embedded in bone (b) and magnified, extracted from animal specimen fragment of implant-bone, indicating in cross-section full bone overgrowth; dark area - biomaterial, clear - bone tissue.



18

Dobór biomateriału implantowego to wciąż kompromis między różnymi własnościami mechanicznymi, technologicznymi i użytkowymi (TABELA 1). Jego wybór na stabilizację chirurgiczną zależy od m.in. cech osobniczych pacjenta, jak np. uczulenie na biomateriał, rodzaju schorzenia, jego umiejscowienia i rozległości oraz przede wszystkim od oczekiwań leczniczych (stabilizacja *"fusion" czy "non-fusion"*). Stopy tytanu charakteryzują się akceptowalną biozgodnością, wysoką wytrzymałością i możliwością śródoperacyjnego dopasowywania do anatomii, a także dużym spektrum możliwości modyfikowania funkcjonalnego powierzchni i nanoszenia powłok. Z drugiej strony stopy tytanu charakteryzują się dużą sztywnością oraz niekorzystnymi własnościami wytrzymałościowymi, powodującymi deformację z pękaniem konstrukcji.

Istotną zaletą jest możliwość wytwarzania z użyciem technologii drukowania dowolnych konfiguracji 3D i projektowania implantów o złożonej przestrzennie budowie, w tym spersonalizowanych. Struktury po EBT pozwalają na uzyskanie korzystnie:

- obniżonego udziału biomateriału w implancie;
- "wulkanicznej" struktury sprzyjającej wnikaniu komórek kostnych z ich proliferacją;
- rozwiniętej powierzchni implantu do przerostu/obrostu kością;
- kratownicowych "otwartych" konfiguracji przestrzennych 3D stanowiących rusztowanie do "wciągania" tkanki kostnej.

Selection of implant biomaterial is still a compromise between the different mechanical, technological and functional properties (TABLE 1). Its choice for the surgical stabilization of implants depends on, among others, individual characteristics of the patient, e.g. allergy to the biomaterial, the type of disease, its location and extent, and above all medical expectations (stabilization "fusion" or "non-fusion"). Titanium alloys are characterized by acceptable biocompatibility, high strength and the possibility of intraoperative matching to the anatomy, as well as a large spectrum of functional surface modification and coatings. On the other hand, titanium alloys are characterized by high stiffness and unfavorable strength properties causing the deformation with cracking of the device.

An important advantage is the possibility of manufacturing with the use of printing technology any 3D configuration and implant designs with complex spatial structure, including the personalized ones. The structures of the EBT allow to obtain preferably:

- reduced share of biomaterial in implant;
- "volcanic" surface favoring the penetration of bone cells with their proliferation;
- expansion of the implant surface for bone ingrowth/ overgrowth;
- lattice -"open" spatial 3D configurations constituting the scaffold for bone tissue intake.

TABELA 1. Wpływ rodzaju materiału Ti6Al4V ELI i PEEK Optima na cechy funkcjonalne i produkcyjne implantu kręgosłupowego.

TABLE 1. The impact of type of material Ti6Al4V ELI and PEEK Optima on functional and productive features of spinal implant.

		Stop Ti Ti Alloy	PEEK
	Cechy wytrzymałościowe / Strength characterist	tics	
1.	Wysoka wytrzymałość High durability	+	-
2.	Elastyczność, moduł Younga zbliżony do struktur biologicznych Flexibility, Young's modulus similar to the biological structures	-	+
3.	Gęstość/ciężar Density/weight	-	+
	Technologiczność / Producibility		
4.	Obrabialność Machining	-	+
5.	Możliwość modyfikacji powierzchni Possibility of surface modifications	+	-
6.	Cena materiału Material price	+	-
7.	Możliwość budowania struktur 3D-Truss Possibility to build 3D truss structures	+	- (?)
	Cechy chirurgiczno-lecznicze / Surgical-therapeutic f	eatures	
8.	Integracja z kością Integration with the bone	+	-
9.	Modelowanie śródoperacyjne Intraoperative modeling	+	-
10.	Przezierność radiologiczna Radiolucency	-	+
11.	Odporność na długotrwałe obciążenia fizjologiczne Resistance to long term physiological loading	+ (?)	+ (?)
12.	Preferowane przeznaczenie - typ stabilizacji Preferred appliance - stabilization type	fusion	non-fusion

Wszystkie powyższe korzyści pozwalają na bezpieczne i skuteczne "mostowanie" dysfunkcyjnego kręgosłupa poprzez budowanie wielopoziomowych bloków biostabilizacyjnych. Polimery PEEK są lżejsze, dobrze tolerowane przez organizm. Mają sprężystość zbliżoną do kości zbitej oraz są przezierne radiologicznie. Dużą niedogodnością tych materiałów jest niska wytrzymałość i problemy z jednorodnością i przyczepnością pokryć mających wspomóc osteointegrację. Sugeruje to konieczność wieloaspektowego rozpatrywania biomateriałów na implanty do chirurgii kostnej i uwzględniania w konstrukcji trudnych do opisu zjawisk biologicznych, fizycznych i chemicznych, towarzyszących przebywaniu w organizmie żywym.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że poprzez dobór materiału oraz konfiguracji 2D i 3D implantu wynikającej z zastosowanej technologii produkcji można wpływać na procesy osteointegracji implantu z kością, przyspieszać leczenie dysfunkcji kręgosłupa poprzez uzyskanie szybszego zespolenia implantu z kością przy biostabilizacji typu "fusion", ograniczać osteointegrację lub nawet uniemożliwiać połączenie implantu z kością przy biostabilizacji typu "non-fusion".

Wnioski

Polimer PEEK Optima charakteryzuje się dobrą biozgodnością w tkankach, sprężystością zbliżoną do kości, przeziernością radiologiczną i jest korzystniejszym materiałem w stabilizacjach typu "*non-fusion*".

Implantowe stopy tytanu w porównaniu z polimerem PEEK są korzystniejszymi biomateriałami na stabilizację międzytrzonową typu *"fusion"* ze względu na sprzyjającą w kontakcie reakcję komórek kostnych, ich "przyczepność" i proliferację, a także możliwości zastosowania technologii przyrostowego drukowania.

Technologie przyrostowe, w tym EBT (*Electron Beam Technology*), pozwalają na wytworzenie "wulkanicznych" powierzchni oraz przestrzennych/kratownicowych Ti-3D-Truss konstrukcji o dużym rozwinięciu powierzchniowym, odpowiedniej nośności biomechanicznej i obniżonej masie.

"Wulkaniczna" struktura powierzchni oraz kratownicowaotwarta konstrukcja Ti-3D-Truss przyspieszają przerost poprzez implant i obrost implantu kością, skracając czas zrostu kostnego o 40÷60 procent.

Pełny przerost kostny po- i wewnątrz implantu pozwala na budowanie bloku bio-stabilizatora kostnego wzmocnionego strukturą Ti-3D-Truss i przenoszenie złożonych stanów obciążeń z implantu na tkanki żywe.

Dotychczasowa praktyka kliniczna wskazuje na poprawę efektywności leczenia, polegającego na "mostowaniu" kręgosłupa za pomocą implantów międzytrzonowych Ti-3D-Truss sprzyjających zrostowi kostnemu.

Podziękowania

W realizacji pracy wykorzystano środki z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013 (nr projektu POIG.01.04.00-08-001/08-00).

Dane dotyczące badań biologicznych, w tym przedstawione na RYS. 2 uzyskano we współpracy z ŁRPN-T w Łodzi; realizacja w ramach projektu LfC POIG.01.04.00-08-001/08-00.

Badania in vivo na zwierzętach, w tym przedstawione na RYS. 5 wykonano we współpracy z SGGW w Warszawie; realizacja w ramach projektu LfC POIG.01.04.00-08-001/08-00. All of these benefits allow the safe and effective "bridging" of dysfunctional spine by building a multilevel blocks of biostabilization. PEEK polymers are lighter, well-tolerated by the body. They have elasticity similar to cortical bone and they are radiolucent. The main disadvantage of these materials is a low strength and homogeneity and adhesion problems of coatings intended to assist osseointegration. This indicates the need for a multifaceted examination of biomaterials for bone surgery implants and consideration in the design difficult to describe the biological, phisical and chemical phenomena accompanying their presence in a living organism.

Results of conducted studies indicate that through material selection and 2D and 3D implant configuration resulting from the used production technique it is possible to influence on the osseointegration process of the implant with bone, to accelerate the treatment of spinal dysfunction by obtaining a faster fixation of the implant with the bone in "fusion" type biostabilization and to limit the osseointegration or even prevent the connection of the implant with the bone in "non-fusion" type biostabilization.

Conclusions

PEEK Optima polymer has a good biocompatibility in tissues, elasticity similar to the bone, radiolucency and it is more favorable material for "non-fusion" stabilization.

Implantable titanium alloys compared to PEEK polymer are more beneficial biomaterials for intervertebral stabilization "fusion" type due to favorable reaction in contact with bone cells, their "adhesion" and proliferation, and also the possibility of appliance of incremental printing technologies.

Incremental technologies, including EBM (Electron Beam Technology), allow to generate "volcanic" surfaces and spatial/truss Ti-3D-Truss structures with a large surface expansion, proper biomechanical load-bearing and reduced mass.

"Volcanic" surface structure and lattice-open Ti-3D-Truss construction accelerates ingrowth through the implant and the implant overgrowth with bone, reducing the time of bone growth by 40÷60 percent.

Full bone overgrowth outside and inside the implant allows to build a bone bio-stabilizer block reinforced by Ti-3D-Truss structure and to transfer the loads from implant to living tissues.

Previous clinical practice suggests an improving of treatment effectiveness involving the "bridging" of spine with intervertebral Ti-3D-Truss implants enhancing the bone growth.

Acknowledgments

In the paper results of studies subsided by European Regional Development Fund within the Programme Innovative Technology, 2007-2013 (nr POIG.01.04.00-08-001/08-00) were used.

Data for biological research, presented on FIG. 2 was obtained in cooperation with ŁRPN-T; LfC project No. POIG.01.04.00-08-001/08-00.

In vivo animal studies presented in FIG. 5 were performed in cooperation with the SGGW Agricultural University; LfC project No. POIG.01.04.00-08-001/08-00.

Pismiennictwo

References •

[1] Ciupik L.F., Zarzycki D.: Spondyloimplantology of advanced spine treatment with DERO system, Polish DERO Group, Zielona Gora 2005.

[2] Ciupik L.F.: "Ivy-like" mimetic mechanism of osteointegration LC for 3D-Frame Ti-alloy implants. Abstract, The 2nd International Conference Innovative Technologies in Biomedicine, Krakow 12-14.10.2015.
[3] Kierzkowska A., Ciupik L.F., Klekiel M., Cecek J., Sterna J., Holper B.: Lumbar intervertebral fixation; acceleration of fusion with a 3D-truss Ti-trabecular implant. Abstract, 41st Congress of the Polish Society of Neurosurgeons, Bydgoszcz 06-09.06.2013.

[4] Wierzchon T., Czarnowska E., Krupa D.: Surface engineering in manufacturing of titanium biomaterials, Publishing House of Warsaw University of Technology, Warszawa 2004.

[5] Pilliar R.M., Lee J.M., Maniatopoulos C.: Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. Clin Orthop Relat Res 208 (1986) 108-113.

[6] Yamamoto D., Kawai I., Kuroda K., Ichino R., Okido M., Seki A.: Osteoconductivity of anodized titanium with controlled micron-level surface roughness. Materials Transactions 52:8 (2011) 1650- 1654.
[7] Ma R., Tang T.: Current strategies to improve the bioactivity of PEEK. Int. J. Mol. Sci. 15 (2014) 5426-5445.

[8] Wang G., Zreiqat H.: Functional coatings or films for hard-tissue applications, Materials 3 (2010) 3994-4050.

[9] Rao P.J., Pelletier M.H., Walsh W.R., Mobbs R.J.: Spine interbody implants: material selection and modification, functionalization and bioactivation of surfaces to improve osseointegration. Orthop Surg 6 (2014) 81-89.

[10] Bertollo N., Da Assuncao R., Hancock N.J., Lau A., Walsh W.R.: Influence of electron beam melting manufactured implants on ingrowth and shear strength in an ovine model. J Arthroplasty 27 (2012) 1429-1436.

[11] Thomsen P., Malmström J., Emanuelsson L., René M., Snis A.: Electron beam-melted, free-form-fabricated titanium alloy implants: Material surface characterization and early bone response in rabbits. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 90 (2009) 35-44.

[12] Murr L.E., Gaytan S.M., Martinez E., Medina F., Wicker R.B.: Next generation orthopaedic implants by additive manufacturing using electron beam melting, International Journal of Biomaterials (2012) 1-14.

[13] Fukuda H.: Additive manufacturing technology for orthopedic implants in: M. Niinomi, T. Narushima, M. Nakai, Advances in Metallic Biomaterials (2015) 3-26.

[14] Ciupik L.F., Kierzkowska A.: Technology-biomechanical evaluation of metal biomaterials derived by layer technology. Engineering of Biomaterials 93 (2010) 14-18.

CHARAKTERYSTYKA MECHANI-CZNA WIELOFUNKCYJNEJ RESORBOWALNEJ PŁYTKI KOMPOZYTOWEJ DO ZESPOLEŃ KOSTNYCH

Karol Gryń*, Barbara Szaraniec, Anna Morawska-Chochół, Jan Chłopek

AGH Akademia Górniczo-Hutnicza, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, al. A. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków *e-mail: kgryn@agh.edu.pl

Streszczenie

W artykule przedstawiono badania mechaniczne prototypowego wszczepu do zespoleń kostnych w postaci resorbowalnej wielofunkcyjnej czterootworowej płytki w kształcie litery I. Testy dotyczyły gotowych implantów w symulowanych warunkach pracy, a nie normatywnych próbek (wiosło, belka) dlatego przygotowano odpowiedni modelowy schemat badawczy implantu. Składał się on z dwóch bloczków imitujących odłamy kostne, połączonych za pomocą badanej płytki, który był poddawany testom mechanicznym w izolowanych stanach naprężeniowo-odkształceniowych (jednoosiowe rozciąganie, trójpunktowe i jednostronne zginanie).

Badano płytki wykonane z dwóch odmian polimeru resorbowalnego (poli-L-laktydu) oraz dwa rodzaje kompozytu, w których osnowę stanowiła jedna z odmian polimeru, a fazą modyfikującą była mieszanina mikrometrycznego proszku ortofosforanu trójwapnia i nanometrycznego hydroksyapatytu. Badano także wpływ geometrii płytek na charakterystyki mechaniczne.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono wyraźny wpływ dodatków ceramicznych na zmianę parametrów wytrzymałościowych płytek wykonanych z różnych materiałów. W przypadku polilaktydu z dopuszczeniem medycznym zaobserwowano spadek wytrzymałości przy jednoczesnym podniesieniu modułu Younga E. Ponadto geometria implantu, czyli w badanym przypadku lokalizacja żeberka wzmacniającego, wpływała na uzyskane wyniki. Lepszymi parametrami cechowały się płytki z żeberkiem wzmacniającym na górnej stronie płytki. Ponadto podczas testów zginania stwierdzono, że przy tego rodzaju geometrii płytki pęknięcie lokalizuje się poza przekrojem krytycznym, a więc taka konstrukcja jest bardziej bezpieczna.

Z grupy przebadanych prototypów, jako najlepsze, wybrano płytki kompozytowe PL38/TCP/HAp, wykonane z poli-L-laktydu medycznego, modyfikowanego mieszaniną proszków ceramicznych z żeberkiem wzmacniającym na powierzchni górnej. Mogą one znaleźć zastosowanie w osteosyntezie, w miejscach które nie są narażone na zbyt duże obciążenia mechaniczne. Do tej grupy zaliczyć można kości w obrębie twarzoczaszki oraz kości krótkie ręki. Zaleca się przy tym zastosowanie usztywniających opatrunków zewnętrznych.

MECHANICAL CHARACTERIZATION OF MULTIFUNCTIONAL RESORBABLE COMPOSITE PLATE FOR OSTEOSYNTHESIS

Karol Gryń*, Barbara Szaraniec, Anna Morawska-Chochół, Jan Chłopek

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKOW, POLAND *E-MAIL: KGRYN@AGH.EDU.PL

Abstract

The article presents the mechanical properties of prototype multifunctional four-hole, I-shaped plate made of resorbable composite and used for osteosynthesis. Multiple tests were conducted on ready--to-use implants and run in simulated real-working conditions. A special customized test stand was constructed for the sake of this research. The model of the osteosynthesis consisted of two rectangular pieces of plexiglas joined together by means of the tested plate. Durability of the physical model was mechanically assessed in static uniaxial tensile, three-point bending, one-side bending tests.

Two types of resorbable polymers (poly-L-lactide) and two types of composites based on these polymers were considered. The composites were modified with a combination of two types of bioceramic: micrometric tricalcium phosphate and nanometric hydroxyapatite. The relation between the geometry of the plate and its mechanical characteristics was also investigated for all the tested materials.

The test results proved that incorporation of bioceramic modifiers into the polylactide matrix influences the mechanical behaviour of the tested bone plates. The composite based on FDA approved polylactide (PL38) revealed the strength decrease while the Young modulus increased at the same time. The mechanical parameters were also dependent on the geometry of the plate (localization of a stiffening rib). Better results were obtained for the plates with a stiffening rib located on the upper side of the plate. What is more, the three-point-bending test revealed that in such a case the crack line moved away from the critical cross section, making such a plate more reliable.

The best parameters were achieved for the threecomponent plates (PL38/TCP/Hap) with a stiffening rib on the upper side. They can be potentially applied for osteosynthesis of the bones submitted with rather low loads, e.g. craniofacial bones, metacarpal bones or phalanges. An external stiff stabilisation (a plaster cast) is recommended as an additional support and prevention. **Słowa kluczowe:** ostoesynteza, zespolenie kostne, płytka zespalająca, płytka kompozytowa, płytka wielofunkcyjna, polimer resorbowalny, polilaktyd, hydroksyapatyt, fosforan wapnia, własności mechaniczne, parametry wytrzymałościowe

[Inżynieria Biomateriałów 133 (2015) 22-33]

Wprowadzenie

W obszarze chirurgii kostnej jedną z technik operacyjnego leczenia złamań i nieprawidłowości zrostu kości jest stabilna osteosynteza, czyli połączenie (czasowe lub na stałe) uszkodzonej tkanki kostnej poprzez wszczepienie elementu lub zespołu elementów stabilizujących odłamy kostne na czas procesu leczenia [1]. W większości przypadków implanty takie, w formie płytek wielootworowych, wykonane są z metalu (np.: stal 316L, tytan i jego stopy) [2,3]. Po zakończeniu leczenia konieczne jest usunięcie takich wszczepów, gdyż mogą one powodować wiele reakcji niepożądanych np.: stany zapalne, uczulenia czy potencjalnie groźne procesy korozyjne [4-9].

Ze względu na specyficzne warunki, w jakich płytki muszą pracować wymagana jest możliwie największa biozgodność oraz odpowiednio dobrana charakterystyka mechaniczna, zbliżona do charakterystyki leczonej kości. Metalowe implanty kostne cechują się wysokimi parametrami mechanicznymi, w tym wysokim modułem Younga, który wielokrotnie przewyższa moduł kości. Z powodu niedopasowania tego parametru często pojawia się tzw. efekt przesztywnienia powodujący odciążenie odbudowującej się tkanki kostnej w miejscu uszkodzenia i tym samym, zgodnie z prawem Wolffa, zatrzymanie procesów jej regeneracji [10]. Z tego powodu prowadzi się szeroko zakrojone badania mające na celu eliminowanie materiałów metalowych i zastępowanie ich innymi o lepiej dopasowanych parametrach mechanicznych. Wymagania takie spełnia grupa polimerów resorbowalnych, do których należą m.in. PLA, PGLA, PGA, PHB. Dodatkowo zastosowanie materiałów biowchłanialnych umożliwia zmianę charakterystyki mechanicznej układu kość-implant w czasie regeneracji i tym samym pozwala na dopasowanie jej do procesu zrostu kostnego. Eliminuje to również problem ciała obcego i ograniczonej biozgodności po osiagnieciu zrostu [11-13].

Zastosowanie polimerów biowchłanialnych, oprócz możliwości bliższego dopasowania ich parametrów wytrzymałościowych do tkanki kostnej pozwala na modyfikowanie ich właściwości i nadawanie im dodatkowych funkcji poprzez wprowadzanie do ich osnowy dodatków, czyli wytworzenie kompozytów [14-17]. Dodatkowa korzyść to łatwość formowania, zwłaszcza grupy termoplastów.

Artykuł opisuje przygotowanie oraz badania wielofunkcyjnych kompozytowych czterootworowych płytek zespalających do osteosyntezy, modyfikowanych mieszaniną fosforanów wapniowych, mających zastąpić powszechnie stosowane płytki metalowe. Na podstawie opracowanych charakterystyk mechanicznych oceniono możliwości wykorzystania i potencjalne obszary zastosowania takich implantów. **Keywords:** osteosynthesis, bone plate, composite plate, multifunctional plate, resorbable plate, polylactide, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, mechanical characterisation, durability

[Engineering of Biomaterials 133 (2015) 22-33]

Introduction

One of the main surgical techniques to treat bone fractures and improper osteosynthesis is a rigid fixation with a bone plate. Such a fixation may be either time-limited or permanent [1]. In most cases the implants are made of metals and alloys, e.g. surgical stainless steel or titanium [2,3]. The drawback of metal implants is the necessity of another surgery. Namely, after the healing process of a broken bone is completed, it is necessary to remove the implant because it may cause swelling, irritation or potentially dangerous corrosion [4-9].

Due to the specific working conditions of the bone plate, it should be highly biocompatible and adequate to the place where it is located. The implant should be also mechanically fitted to the surrounding bone. Metal implants have high strength and Young modulus, much higher than the natural bone, which is not advantageous in this case. The effect called "overstiffness" means that the bone is not properly stimulated and the healing processes is obstructed [10]. This is the reason why scientists are trying to elaborate new materials for bone healing applications. There is a big group of resorbable polymers, e.g. PLA, PGLA, PLDL, PGA, whose mechanical parameters can change during degradation and adapt to the actual "needs" of the healing bone. When a resorbable plate is used, no additional surgery for the implant removal is needed [11-13].

Fabrication of bone plates using resorbable polymers offers other important advantages, too. Firstly, it is quite easy to modify their parameters by composite preparation [14-17]. Moreover, the injection moulding method can be applied, making the large and cost-effective mass production possible.

The article presents the research results on multifunctional resorbable composite bone plates modified with calcium phosphates dedicated for osteosynthesis. Such implants are supposed to replace commonly used oldfashioned metal ones. Our research assessed the potential use and fields of application.

> MGINEERING O MATERIALS

24

Przygotowanie materiałów

Opracowany kompozyt składał się z resorbowalnej matrycy polimerowej - poli(L-laktydu). Zastosowano dwa rodzaje polilaktydu – "techniczny" PLLA Ingeo 3251D amorficzny polimer resorbowalny (Nature Works) oraz "medyczny" z dopuszczeniem FDA do zastosowań w medycynie PURASORB PL38 (PURAC). Wprowadzono modyfikatory w postaci dodatków bioceramicznych, których łączny udział objętościowy nie przekraczał 8%. Były to: mikrometryczny proszek fosforanu trójwapnia βTCP (Chema Elektromet) oraz nanometryczny hydroksyapatyt HAp (Chema Elektromet). Oba proszki posiadały dopuszczenie do zastosowań medycznych.

Do badań przygotowano łącznie osiem rodzajów próbek. Wybrano cztery rodzaje materiałów tj. polilaktyd techniczny (PLA), polilaktyd medyczny (PL38) oraz kompozycje oparte na obu rodzajach osnowy PLA/TCP/HAp i PL38/TCP/HAp. Z każdego rodzaju materiału wykonano dwa warianty geometryczne płytki czterootworowej I (RYS. 1).

Do wytworzenia próbek zastosowano wtryskarkę pionową Multiplas V4-S-15N wyposażoną w ślimakowy układ uplastyczniający. Granulaty polimerowe oraz proszki bioceramiczne suszono w cieplarce laboratoryjnej w temp. 37°C przez 24 h. Składniki kompozytów w odpowiednio odważonych proporcjach (waga analityczna ±0,001 g - RADWAG PS 360/C/2) wymieszano wstępnie poprzez wstrząsanie. Przygotowaną mieszankę zasypywano do leja podawczego wtryskarki. W temp. ok. 200°C ruchem obrotowym ślimaka homogenizowano uplastyczniony wsad, który następnie wtryskiwano do formy (dane technologiczne zamieszczono w TABELI 1). Przed otwarciem formy stosowano 10 sekundowy okres chłodzenia tworzywa w celu jego konsolidacji.

Charakterystyka płytek typu I

Otrzymano płytki czterootworowe typu I (dł. 29 mm, szer. 7 mm, gr. 2 mm, średnica otworu 3 mm, stożkowe gniazdo pod łeb śruby mocującej). Z każdego rodzaju materiału wykonano dwa warianty geometryczne różniące się między sobą położeniem żeberka wzmacniającego. RYS. 1 przedstawia projekt konstrukcyjny przygotowanych płytek i różnice w ich przekrojach poprzecznych.

RYS. 1. Prototypowa płytka i jej przekrój poprzeczny: a) typu N; b) typu R. FIG. 1. Prototypes of the plate and their cross-section: a) N type; b) R type.

Materials and Methods

Materials preparation

The composite consisted of the two types of polymer matrix: medical grade poly(L-lactide) PL38 Purasorb (Purac) and poly(L-lactide) PLLA Ingeo 3251D (Nature Works) not approved by FDA. A mixture of two calcium phosphate powders was used as a modifying phase. Micrometric β -tricalcium phosphate (Chema Elektromet) and nanometric hydroxyapatite (Chema Elektromet) with medical application approval were incorporated into the two types of matrix.

For the studies four kinds of materials were prepared: poly(L-lactide) (PLA), medical grade poly(L-lactide) (PL38), and compositions based on both types of polymer matrix - PLA/TCP/HAp and PL38/TCP/HAp. Each material was formed in two geometrical shapes of the plates (FIG. 1), thus obtaining eight variants to be tested.

The injection moulding machine Multiplas V4-S-15N with the vertical screw plastifying unit was used to fabricate the plates. Granulates and ceramic powders were dried in a laboratory incubator (37°C/24 h). The components of the composite were weighed using the analytical scale ±0.001 g; RADVAG-PS 360/C/2. The proper amounts were mixed by shaking and the mixture was inserted into the feed hopper of the moulding machine. The mixture got plasticized and homogenized by means of the rotating screw at the temperature of about 200°C. Next it was injected into the mould (the technological parameters presented in TABLE 1). The material was cooled for 10 s before opening the mould.



TABELA 1. Parametry technologiczne otrzymywania (wtrysku) czterootworowych płytek I. TABLE 1. Technological parameters of injection moulding process to fabricate the four-hole I-shaped plates.

Materiał	Temperatura / Temperature [°C]		Ciśnienie*	Przepływ	Czas wtrysku	Czas chłodzenia		
Material	Strefa 1 Zone 1	Strefa 2 Zone 2	Strefa 3 Zone 3	[kg/cm ²]	[%]	[s]	Cooling time [s]	
PLA	160	165	168	80	60	5	10	
PLA/TCP/HAp	165	170	175	80	60	5	15	
PL38	215	210	210	80	60	5	10	
PL38/TCP/HAp	200	185	185	80	60	5	10	
* ciśnienie w układ	zie hvdraulicz	nvm wtrvskarł	(i (ślimaka)			·		

the pressure in the hydraulic system of injection molding machine (perpetual screw)

Zastosowano następujące oznaczenie: płytka I typu N posiadała żeberko wzmacniające po stronie mocowania do odłamu kostnego, natomiast w płytce I typu R po stronie przeciwnej.

Płytka I posiada cztery otwory. Dzięki nim, za pomocą śrub lub wkrętów, może zostać ona przymocowana do uszkodzonej kości, prostopadle do złamania, po obu jego stronach.

Metody badań

Badania laboratoryjne implantów powinny być realizowane w taki sposób, aby jak najlepiej odwzorowywały warunki pracy wszczepu. W tym celu przygotowano modelowe zespolenie imitujące dwa odłamy kostne (bloczki z PMMA o wymiarach: 50 mm x 25 mm x 8 mm). Oddalono je od siebie o ok. 1,5 mm symulując tym samym szczelinę złamania. Płytki I mocowano do bloczków PMMA za pomocą nierdzewnych śrub z łbem stożkowym i nakrętką (M2,5 A4-70).

Zmontowane układy poddawano badaniom mechani--cznym. Wyznaczano charakterystyki naprężeniowo--odkształceniowe w próbach: statycznego jednoosiowego rozciągania (RYS. 2a), trójpunktowego zginania w płaszczyźnie czołowej (RYS. 2b). Przeprowadzono również testy zginania jednostronnego sztywno zamocowanej płytki nazwane roboczo "zginaniem jednostronnym" (RYS. 2c).

Plate characteristics

The materials were formed into "I-shaped" plates with four holes. Their measurements were as follows: length -29 mm, width -7 mm, height -2 mm. The diameter of the holes was 3 mm and they were conical in shape. The two geometrical shapes of the plates were fabricated from each material: the N type with a stiffening rib on the bottom surface (closer to the bone), and the R type with a stiffening rib on the upper side. The difference between N and R types is shown in FIG. 1. There were four holes in each plate which were used to screw the implant to the bone.

Methodology

The tests were conducted so as to simulate the real working-conditions of the implant, thus a special model of osteosynthesis was prepared. Two blocks of Plexiglas (PMMA) measuring 50 mm x 25 mm x 8 mm were cut. The plates were mounted on the blocks using stainless steel screws with nuts (M2.5 A4-70). The gap between the PMMA blocks simulating a bone fracture measured 1.5 mm in width.

Such models were tested in standard mechanical tests: uniaxial static tension (FIG. 2a), three-point bending (FIG. 2b) and one-side bending (FIG. 2c).



RYS. 2. Schematy przeprowadzonych testów mechanicznych: a) statyczne jednoosiowe rozciąganie, b) trójpuntowe zginanie, c) zginanie jednostronne.

FIG. 2. Schemes of mechanical tests: a) uniaxial tension, b) three-point-bending, c) one-side bending.

Testy mechaniczne zakładały wyznaczenie: modułu Younga (E), odkształcenia przy maksymalnej sile (ϵ_{Fmax}), wytrzymałości na rozciąganie (R_m) i trójpunktowe oraz jednostronne zginanie (R_z).

Modele zespolenia badano w temperaturze pokojowej na maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435 wyposażonej w głowicę pomiarową o maksymalnym zakresie obciążenia do ±500 N sprzężonej z oprogramowaniem TestXpert v 8.1. Testy prowadzono zgodnie z zaleceniami odpowiednich norm: dla jednoosiowego rozciągania: *PN-EN ISO 527-1:1996: Tworzywa sztuczne - Oznaczanie właściwości mechanicznych przy statycznym rozciąganiu*; dla trójpunktowego zginania: *PN-EN ISO 178:2010(E) - Tworzywa sztuczne - Oznaczanie właściwości przy zginaniu*; dla jednostronnego zginania sztywno zamocowanej płytki: *PN-EN ISO 7438:2005 – Metale – próba zginania*. We wszystkich testach zastosowana prędkość przesuwu trawersy wynosiła 2 mm/min. The mechanical tests were conducted to assess Young modulus (E), deformation at maximum force (ϵ_{Fmax}), tensile strength (R_m), three-point bending and one-side bending strength (R_z).

All the models were tested using universal testing machine Zwick 1435 - the velocity of 2 mm/min, room temperature, maximum force \pm 500 N. The applied software was TestXpert v8.1. The testing procedures were conducted in compliance with the standards: for uniaxial tension *PN-EN ISO* 527-1:1996, for three-point bending *PN-EN ISO* 178:2010(*E*), for one-side bending *PN-EN ISO* 7438:2005.

Since the tested plates were endowed with irregular shapes, different from the normative ones (paddle or barshaped), thus the specific geometrical parameters had to be assumed: for the thickness of the plate - b, for the width of the plate - the width d minus the diameter of the mounting hole a (FIG. 3).



RYS. 3. Parametry geometryczne płytek l przyjęte do badań mechanicznych. FIG. 3. Geometrical parameters of the I-shaped plates assumed for mechanical tests.

Wyniki badań i dyskusja

Jednoosiowe rozciąganie

Po przeprowadzonych badaniach statycznego jednoosiowego rozciągania wszystkich wariantów płytek uzyskano zestaw krzywych $\sigma = f(\epsilon)$ (RYS. 4). Obliczono średnie wartości wytrzymałości na rozciąganie R_m, moduł Younga E oraz odkształcenie przy maksymalnej ϵ_{Fmax} i na tej podstawie sporządzono odpowiednie wykresy (RYS. 5).

Results and Discussion

Uniaxial tensile test

The set of stress-strain curves $\sigma = f(\epsilon)$ was obtained from uniaxial tensile tests conducted on all the variants of the plates (FIG. 4). The average values of tensile strength R_m , Young modulus E and deformation at maximum force ϵ_{Fmax} were calculated. The diagrams were constructed on the basis of the results (FIG. 5).



FIG. 4. Examples of the stress-strain curves of the I-shaped plates obtained in uniaxial tensile test.



RYS. 5. Zestawienie parametrów mechanicznych badanych płytek I w teście jednoosiowego statycznego rozciągania.

FIG. 5. Comparison of mechanical parameters of the I-shaped plates obtained in uniaxial tensile tests.

Najwyższą wytrzymałość (typ R: 65,59 ±5,01 MPa; typ N: 55,59 ±2,16 MPa) oraz największy zakres odkształcenia (typ R: 1,9 ±0,11 mm; typ N: 1,29 ±0,18 mm) wykazały płytki z czystego polimeru medycznego PL38. Wprowadzenie modyfikatorów spowodowało nieznaczne obniżenie tych parametrów (typ R: R_m = 53,72 ±2,72 MPa, ϵ_{Fmax} = 1,07 ±0,22 mm; typ N: R_m = 36,39 ±1,05 MPa, ϵ_{Fmax} = 1,47 ±0,23 mm). W przypadku polimeru technicznego stwierdzono zależność odwrotną. Kompozyt PLA/TCP/HAp miał wyższą wytrzymałość (typ R: 47,74 ±3,03 MPa, typ N: 45,51 ± 2,2 MPa) niż czysty polimer PLA (typ R: 38,53 ±1,64 MPa, typ N: 45,83 ±1,62 MPa) i zakres plastyczny również w niewielkim stopniu się zwiększył (typ R: z 1,30 ±0,18 mm dla PLA do 1,39 ±0,4 mm dla PLA/TCP/HAp; typ N: z 1,53 ±0,05 mm dla PLA do 1,58 ±0,23 mm dla PLA/TCP/HAp).

Stwierdzono także wpływ geometrii płytki na parametry wytrzymałościowe. Lepsze wyniki uzyskano dla płytek z żeberkiem wzmacniającym zlokalizowanym na górnej powierzchni (typ R). Związane jest to z wielkością pola przekroju krytycznego, które dla płytek typu R jest o ok. 10% większe od pola przekroju płytek typu N.

Z punktu widzenia dopasowania charakterystyk mechanicznych badanych materiałów do tkanki kostnej zbitej uzyskano zadowalające wyniki. Kompozytowe płytki z osnową z polimeru medycznego PL38/TCP/HAp wykazują zbliżoną do kości wartość modułu Younga (typ R: 10,28 ±0,26 GPa; typ N: 11,0 ±0,51 GPa), co jest bardzo korzystne ze względu na niwelowanie efektu przesztywnienia. Niższa od kości wytrzymałość na rozciąganie nie dyskwalifikuje ich z potencjalnego zastosowania do zespoleń kostnych. Płytki takie mogą być z powodzeniem stosowane w połączeniu ze stabilizacją zewnętrzną w postaci opatrunku usztywniającego.

The pure medical range polymer PL38 revealed the highest value of the strength (R type: 65.59 ±5.01 MPa; N type: 55.59 ±2.16 MPa) and the highest range of plastic deformation (R type 1.9 ±0.11 mm; N type: 1.29 ±0.18 mm). The incorporation of the modifiers resulted in the slight increase in those parameters (R type: R_m = 53.72 ±2.72 MPa, ε_{Fmax} = 1.07 ±0.22 mm; N type: 36.39 ±1.05 MPa, 1.47 ±0.23 mm). For the technical polymer PLA the reverse relation was observed. The PLA/TCP/HAp composite had a higher value of tensile strength (R type: 47.74 ±3.03 MPa, N type: 45.51 ± 2.2 MPa) than the pure polymer PLA (R type: 38.53 ±1.64 MPa, N type: 45.83 ±1.62 MPa). The range of the plastic deformation also slightly increased. Namely, for the R type it was 1.30 ±0.18 mm for pure PLA, while after the TCP/HAp modification it changed to 1.39 ±0.4 mm. In turn, for the N type the value of the plastic deformation was 1.53 ±0.05 mm for pure PLA, whereas for the TCP/HAp variant it was 1.58 ±0.23 mm.

Additionally, the geometry of the plate also had an influence on the strength parameters. It appeared that better results were achieved for the plates with a stiffening rib in the upper surface (R type). Such a phenomenon is connected with the value of the cross section surface area which is 10% higher for the R type as compared to the N type.

All the tested materials proved to be compatible with bone tissue as far as their mechanical properties are concerned. The Young modulus values for the PL38/TCP/HAp composite plates (R type: 10.28 \pm 0.26 GPa; N type: 11.0 \pm 0.51 GPa) were comparable to the bone, which is extremely beneficial in reduction in the stress shielding effect. The tensile strength value - lower than the real bone - does not exclude the plates from medical applications. Such implants are efficient, especially when combined with an external stabilization e.g. a plaster cast.

BI MATERIALS

Trójpunktowe zginanie

28

ш

W celu pełnego scharakteryzowania wytrzymałości mechanicznej prototypowej płytki, przeprowadzono testy trójpunktowego zginania. Badano płytki typu N i R ze wszystkich rodzajów materiałów. Przyjęto wymiary próbek zgodnie z założeniami zamieszczonymi w rozdziale "Metody badań".

Modelowe zespolenie tj. płytkę I przymocowaną śrubami do bloczków PMMA umieszczono na stanowisku badawczym i poddano obciążeniu zginającemu (RYS. 6). Odległość między podporami wynosiła 50 mm. Czoło stempla ustawiono dokładnie w połowie długości płytki. Prędkość przesuwu stempla wynosiła 2 mm/min.

Przykładowe charakterystyki naprężeniowo-odkształceniowe uzyskane w testach przedstawiono na RYS. 6. Średnie wartości maksymalnej siły F_{max} , odkształcenia przy maksymalnej sile \mathcal{E}_{Fmax} , wytrzymałości na trójpunktowe zginanie R_z oraz modułu Younga E pokazano na RYS. 7.

Stwierdzono, podobnie jak przy testach statycznego jednoosiowego rozciągania, że wprowadzenie dodatków do PLA wzmocniło i poprawiło odkształcalność, a w przypadku PL38 nieznacznie obniżyła się wytrzymałość, zaś zakres odkształcenia plastycznego zmniejszył się prawie trzykrotnie. Lepsze wyniki uzyskano dla płytek z żeberkiem wzmacniającym po stronie górnej (typ R). Płytka PL38/TCP/ HAp R posiadała wytrzymałość na trójpunktowe zginanie (143,29 ±10,49 MPa) zbliżoną do wytrzymałości kości. Jej moduł Younga (21,87 ±3,29 GPa) w niewielkim stopniu przewyższał moduł sztywności kości, jednak różnica ta mieści się w akceptowalnym zakresie.

Na RYS. 9 przedstawiono przykładowe płytki po teście trójpunktowego zginania. W obu przypadkach widoczne jest pęknięcie na spodniej stronie, jednak wszystkie płytki zachowały spójność i nie dochodziło do całkowitej dekohezji. Zauważalna jest różnica w wielkości odkształcenia różnych materiałów (kąt). Dla płytki PL38 jest on znacznie większy niż w przypadku płytki z kompozytu PL38/TCP/HAp (RYS. 8).

Three-point bending test

Three-point bending test was conducted in order to characterize the mechanical strength of the prototype plates. All the geometrical and material variants of the plates were examined.

The model osteosynthesis underwent the three-point bending test (FIG. 6). The distance between the supporting points measured 50 mm. The axis of the bending punch was exactly in the middle of the plate's length. The speed of the punch was 2 mm/min.

The representative strain-stress characteristics are presented in FIG. 6. The average values of maximum bending force F_{max} , deformation at the maximum force ϵ_{Fmax} and Young modulus E are shown in the diagrams (FIG. 7).

In general, the incorporation of the bioceramic modifiers into the polymer matrix improved both the tensile strength and plasticity. The best results were obtained for the PL38/TCP/HAp R type plate. Its three-point bending strength was 143.29 \pm 10.49 MPa – the value similar to that of bone. Young modulus 21.87 \pm 3.29 GPa was only slightly higher than the one of the bone, but still within the acceptable range.

In FIG. 9 the examples of the damaged plates are presented. In both geometrical cases (R and N types) the crack is localized on the bottom surface of the plate. None of the damaged samples broke apart. The different range of the deformation angle, wider for the PL38/TCP/ HAp plate is visible (FIG. 8).



RYS. 6. Przykładowe przebiegi krzywych zginania trójpunktowego.

FIG. 6. Examples of the stress-strain curves of the I-shaped plates obtained in three-point-bending tests.



RYS. 7. Zestawienie charakterystyk mechanicznych pytek I uzyskanych w próbach trójpunktowego zginania. FIG. 7. Comparison of mechanical parameters of the I-shaped plates obtained in three-point bending tests.



RYS. 8. Przykładowe płytki I typu R z PL38 i PL38/TCP/HAp po teście trójpunktowego zginania. Płytka kompozytowa osiągnęła znacznie mniejsze odkształcenie plastyczne - wyraźnie mniejszy kąt. FIG. 8. Examples of the I-shaped type R plates made of PL38 and PL38/TCP/HAp after three-point bending test. Lower plastic deformation of the composite plate was recorded.

Dodatkowo zaobserwowano zależność lokalizacji linii pęknięcia i położenia żeberka wzmacniającego. W przypadku płytek z żeberkiem na dole (typ N) (RYS. 9a), pęknięcie przebiegało w obszarze otworu mocującego bliższego szczelinie imitującej pęknięcie kości i przechodziło ono niemal dokładnie przez przekrój krytyczny. Płytki z żeberkiem na górze (typ R) (RYS. 9b) pękały w miejscu przyłożenia siły zginającej – w połowie ich długości. Charakterystyki pękania były niezależne od rodzaju materiału z jakiego wykonana była płytka. Tym samym jednoznacznie potwierdzono, że czynnikiem decydującym o lokalizacji linii pęknięcia jest geometria płytki.

Taking into consideration the spot of the crack, it was revealed that the position of a stiffening rib was essential, regardless of the material. In the N type plates the crack propagated through the critical cross section (through the hole) (FIG. 9a), whereas in the R type the crack occurred in the middle of the plate (FIG. 9b). The process of the plate fracture does not depend on the type of plate material. Thus it confirms that the shape of the plate is the factor that influences the fracture characteristics, not the type of the material.



RYS. 9. Przykłady próbek po teście trójpunktowego zginania: a) typ N; b) typ R. Widoczna różnica w lokalizacji linii pęknięcia. Charakterystyka przebiegu pęknięcia dla płytek z kompozytu taka sama jak z czystego technicznego polimeru.

FIG. 9. Examples of the plates after three-point-bending test: a) N type; b) R type. There is a different localization of the crack line, depending on the plate type (N or R) but regardless of the material. Similar results for composite and pure polymer plates were revealed.

Jednostronne zginanie

Testy jednostronnego zginania miały na celu weryfikację sposobu mocowania implantu, który realizowany jest poprzez przykręcenie płytki do kości kolejnymi (jedna po drugiej) śrubami/wkrętami. Tym samym konieczne jest określenie dopuszczalnych sił zginających (doginających) oraz zakresu odkształceń, które nie powodują jej uszkodzenia. Zebrane w testach wyniki przedstawiono w postaci zbiorczego wykresu z przebiegami krzywych zginania wszystkich wariantów badanych płytek (RYS. 10). Obliczone wartości średnie poszczególnych parametrów wyznaczanych w próbie przedstawiono na wykresach (RYS. 11).

One-side bending

For the sake of the fixation procedure the one-side bending test was conducted. During the test only one half of the plate was firmly fixed. The other half (the loose one) was loaded to establish the safe range of the bending force without damaging the plate. All the variants of the plates were tested and the summary of the results is presented in FIG. 10. The average values of all the calculated parameters are shown in the diagrams (FIG. 11).



RYS. 10. Przykładowe krzywe zginania jednostronnego płytek I. FIG. 10. Examples of one-side bending stress-strain curves of the I-shaped plates.

Parametry mechaniczne uzyskane w tych próbach co do przebiegów krzywych zginania i ich charakteru są zbieżne z uzyskanymi w próbie trójpunktowego zginania. Wpływ dodatków i różnice w geometrii płytek dają analogiczne rezultaty. Jedyna różnica to wartości modułu Younga, które w przypadku zginania jednostronnego są o rząd wielkości mniejsze niż w próbie trójpunktowego zginania. Może być to spowodowane różną długością ramienia działającej siły. W przypadku trójpunktowego zginania próbki były sztywno zamocowane śrubami przez wszystkie otwory. Tym samym odcinek podlegający faktycznemu zginaniu był odległością pomiędzy punktem podparcia a czołem stempla (25 mm). Podczas jednostronnego zginania płytka była sztywno zamocowana tylko z jednej strony, dwoma śrubami. Druga połowa płytki nie była podparta, a oś stempla realizującego nacisk przechodziła przez środek najdalszego otworu (RYS. 10). Na początku testu ramie zginające miało długość ok. 13 mm. Ponadto czoło stempla w trakcie odkształcania mogło się swobodnie przesuwać po powierzchni płytki zwiększając tym samym długość ramienia zginającego (nawet do 16 mm), podczas gdy w próbie trójpunktowego zginania takiej możliwości nie było i ramię zginające miało cały czas taką samą długość.

The deformation curves of the plates obtained in the oneside and three-point bending tests showed similar characteristics. The incorporation of the modifying phase and the differences in the geometry of the samples also revealed analogical effects. The only deviation observed was in the value of Young modulus. In the one-side bending test the obtained value was much higher than the one from the threepoint bending test. A possible reason for such a phenomenon might be connected with the length of the bending arm. For the three-point bending test the rigid fixation was applied (including all four holes) and the length of the bending arm measured 25 mm. For the one-side bending test only one half of the plate was fixed with two screws and the load was applied to the loose segment of the plate (FIG. 10). During the deformation the punch could slip down the plate, that is why the bending arm length changed from 13 mm to 16 mm.



RYS. 11. Zestawienie wyników uzyskanych w próbie jednostronnego zginania. FIG. 11. Comparison of mechanical parameters of the I-shaped plates obtained in one-side bending tests.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań i analiz stwierdzono, że dodatek ceramiki do polilaktydu technicznego PLA powodował obniżenie wytrzymałości i jednocześnie uplastyczniał materiał. Dla polilaktydu medycznego PL38 wraz z wprowadzeniem dodatków bioceramicznych zarejestrowano zmniejszenie zarówno wytrzymałości, jak i plastyczności. Ponadto ujawniono wpływ geometrii płytki. Lepsze wyniki uzyskano dla płytek z żeberkiem wzmacniającym zlokalizowanym na powierzchni górnej (typu R). Wykazywały one trzy razy wyższą wytrzymałość w porównaniu z płytkami z żeberkiem wzmacniającym po stronie dolnej (typu N). Lokalizacja żeberka wpływała także na charakter linii pęknięcia podczas trójpunktowego zginania. Również w tym przypadku lepsze wyniki uzyskano podczas testów płytek typu R. Pęknięcia pojawiały się zawsze w połowie długości płytki, a nie w przekroju krytycznym.

Odnosząc się do danych literaturowych dotyczących charakterystyk mechanicznych kości zbitej (wytrzymałość na rozciąganie 80-120 MPa, moduł Younga E 7-20 GPa; w próbie zginania wytrzymałość 130-240 MPa i moduł Younga E 9-16 GPa) [18] i porównując je z wartościami uzyskanymi w testach, można stwierdzić, że badane płytki znajdą zastosowanie do zespoleń odłamów kostnych, gównie w obszarach, które nie są narażone na zbyt duże obciążenia mechaniczne np.: w obrębie twarzoczaszki czy kości krótkich ręki.

Pewien zakres sprężystości cechujący płytki umożliwia mikroruchy odłamów, niwelując jednocześnie efekt przeszytwnienia zespolenia oraz zapewnia odpowiedni rozkład naprężeń w odbudowującej się kości.

Summary

The conducted tests and analysis of the results revealed that modification of the technical polylactide PLA with ceramics caused its tensile strength decrease, although at the same time it plasticized the material. On the other hand, the medical grade polylactide PL38 underwent the decrease in both strength and plasticity after the modifier application. Moreover, the geometry of the plate proved to be a key factor. More promising results were obtained for the plates with a stiffening rib on the upper side (R type). Such plates were three times more durable than the plates with a rib on the bottom side (N type). The location of a stiffening rib also influenced the characteristics of the crack occurring during the three-point bending test. Here the better results were also obtained for the R type plates, as the crack appeared always in the middle of the plate, but not in the critical cross section.

In comparison to the literature data concerning the mechanical characteristics of cortical bone (tensile strength 80-120 MPa and Young modulus 7-20 GPa; bending strength 130-240 MPa and Young modulus E 9-16 GPa) [18] our results confirm that the tested plates may be applied for osteosynthesis, mainly in the areas exposed to low loads, e.g. the craniofacial bones, metacarpal bones or phalanges.

A certain range of elasticity of the plate allows micromovements of the bone fragments hence stresses are distributed on the healing bone and stress shielding effect is annihilated. Although active ceramics incorporated into the polylactide matrix slightly lower its mechanical properties, they are also released on the site of the recovery. Wprowadzone do polilaktydu aktywne dodatki ceramiczne, co prawda obniżają nieznacznie jego właściwości mechaniczne, jednak zgodnie z doniesieniami literaturowymi wraz z resorbującą matrycą będą uwalniane w leczonym miejscu. Tym samym będą wpływać korzystnie i przyspieszająco na procesy zdrowienia i odbudowy ciągłości tkanki kostnej. Zatem oprócz mechanicznego pozycjonowania odłamów kostnych płytka będzie posiadać dodatkową funkcję wspomagającą leczenie złamania.

Dodatkową przesłanką przemawiającą na korzyść stosowania kompozytowych płytek do zespoleń kostnych jest łatwość ich formowania, zwłaszcza przy zastosowaniu metody wtrysku, która cechuje się dużą wydajnością, powtarzalnością procesu, wysoką dokładnością i tolerancją wymiarową, wysokim stopniem homogenizacji materiału oraz możliwością wytwarzania wyprasek o skomplikowanych kształtach. Dzięki zastosowaniu wtryskarki, w jednym procesie, otrzymuje się płytkę gotową do implantacji bez konieczności zastosowania obróbki wykańczającej, co przy produkcji masowej, przekłada się bezpośrednio na niski jednostkowy koszt produkcji. Biorąc powyższe pod uwagę można stwierdzić, że wielofunkcyjne płytki kompozytowe będą stanowić silną konkurencję dla powszechnie stosowanych płytek metalowych.

Podziękowania

Badania wykonano przy współpracy z firmą MEDGAL w ramach projektu badawczo-rozwojowego: "Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji innowacyjnych implantów kostnych z kompozytów polimerowych" (POIG.01.04.00-20-003/10).

Pismiennictwo

[1] Mow V.C., Huiskes R. eds.: Basic orthopaedic biomechanics & mechano-biology. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

[2] Bouloux G.F., Chen S., Threadgill J.M.: Small and large titanium plates are equally effective for treating mandible fracture. J Oral Maxillofac Surg 70 (2012) 1613-21.

[3] Uhthoff H.K., Poitras P., Backman D.S.: Internal plate fixation of fractures: short history and recent developments. J Orthop Sci 11 (2006) 118-126.

[4] French H.G., Cook S.D., Haddad R.J.: Correlation of tissue reaction to corrosion in osteosynthetic devices. J Biomed Mater Res 18 (1984) 813-828.

[5] Park K.T., Lee K.B.: Extensive metallosis caused by plate and screw construct for distal fibular fracture - a case report. Journal of the Korean Fracture Society 26 (2013) 147-150.

[6] Edelstein Y., Ohm H., Rosen Y.: "Metallosis and pseudotumor after failed ORIF of a humeral fracture. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases 69 (2011) 188-191.

[7] Kang R., Stern P.J.: Humeral nonunion associated with metallosis secondary to use of a titanium flexible humeral intramedullary nail: a case report. J Bone Joint Surg [Am] 84 (2002) 2266-2269.

[8] Keegan G.M., Learmonth I.D., Case C.P.: Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient. J Bone Joint Surg [Br] 89B (2007) 567-573.

[9] Hallab N., Merritt K., Jacobs J.J.: Metal Sensitivity in Patients with Orthopaedic Implants. J Bone Joint Surg [Am] 83 (2001) 428.
[10] Frost H.M.: Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. Angle Orthod. 64 (1994) 175-188.

[11] Kramp B., Bernd H.E., Schumacher W.A., Blynow M., Schmidt W., Kunze C., Behrend D., Schmitz K.P.: Poly-beta-hydroxybutyric acid (PHB) films and plates in defect covering of the osseus skull in a rabbit model. Laryngorhinootologie 81 (2002) 351-356. Apart from the mechanical stabilization of the bone fragments, they facilitate the healing process and regeneration of the bone tissue.

The formability and the possibility of the composite fabrication is an additional advantage of injection moulding. This technique is also characterized by high efficiency, repeatability, precision, high level of the homogeneity of the material, and finally – the possibility to fabricate the plates with irregular shapes. When the injection moulding technique is applied, the ready-to-use implant is obtained. No final post-processing treatment is necessary, which makes the mass production economical. Taking into account all the above, it may be claimed that multifunctional resorbable composite plates may easily compete with commonly used metal implants.

Acknowledgements

The study was performed in collaboration with MEDGAL Company within the R & D project: "Elaboration and implementation of the production technology of innovative bone implants made of polymer composites" (POIG.01.04.00-20-003/10).

References

[12] Nair L.S., Cato T.L.: Biodegradable polymers as biomaterials. Progress in Polymer Science 32 (2007) 762-798.

[13] Morawska-Chochół A., Jaworska J., Chłopek J., Kasperczyk J., Dobrzyński P., Paluszkiewicz C., Bajor G.: Degradation of poly(lactide-co-glycolide) and its composites with carbon fibres and hydroxyapatite in rabbit femoral bone. Polymer Degradation and Stability 96 (2011) 719-726.

[14] Szaraniec B.: Durability of biodegradable internal fixation plates. Materials Science Forum 730-732 (2013) 15-19.

[15] Bartkowiak-Jowsa M., Kwiatkowska A., Będziński R., Pezowicz C., Filipiak J., Szaraniec B., Chłopek J.: Mechanical properties and dynamics of degradation of polylactide matrix composites with calcium and sodium alginate fibers. Journal of Composite Materials 48 (2014) 815-824.

[16] Morawska-Chochół A., Domalik-Pyzik P., Chłopek J., Szaraniec B., Sterna J., Rzewuska M., Boguń M., Kucharski R., Mielczarek P.: Gentamicin release from biodegradable poly-L-lactide based composites for novel intramedullary nails. Materials Science and Engineering C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems 45 (2014) 15-20.

[17] Szaraniec B., Gryń K., Szponder T., Żylińska B.: Biodegradable fixation plates for veterinary medicine. Engineering of Biomaterials 125 (2014) 30-36.

[18] Yuehuei A.H., Draughn R.A.: Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. CRC Press LLC 2000 ISBN 0-8493-0266-8.

STUDIA PODYPLOMOWE Biomateriały – Materiały dla Medycyny 2015/2016

Organizator: Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Katedra Biomateriałów Kierownik: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła	Adres: 30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 30 Pawilon A3, p. 208 lub p. 210 tel. 12 617 44 48, 12 617 23 38, fax. 12 617 33 71 email: epamula@agh.edu.pl; krok@agh.edu.pl http://www.agh.edu.pl/ksztalcenie/oferta-ksztalcenia/
Sekretarz: Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz	studia-podyplomowe/biomaterialy-materialy-dla-medycyny/
Charakterystyka: Tematyka prezentowana w trakcie zajęć obejmuje przegląd wszystkich grup materiałów dla zastosowań medycznych: metalicznych, ceramicznych, polimerowych, węglowych i kompozytowych. Słuchacze zapoznają się z metodami projek- towania i wytwarzania biomateriałów a następnie możliwościami analizy ich właściwości mechanicznych, właściwości fizykochemicznych (laboratoria z metod badań: elektronowa mikroskopia skaningowa, mikroskopia sił atomowych, spek- troskopia w podczerwieni, badania energii powierzchniowej i zwilżalności) i właściwości biologicznych (badania: <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>). Omawiane są regulacje prawne i aspekty etyczne związane z badaniami na zwierzętach i badaniami klinicznymi (norma EU ISO 10993). Słuchacze zapoznają się z najnowszymi osiągnięciami w zakresie nowoczesnych nośników leków, medycyny regeneracyjnej i inżynierii tkankowej.	
Sylwetka absolwenta: Studia adresowane są do absolwentów uczelni technicznych (inżynieria materiałowa, technologia chemiczna), przyrodni- czych (chemia, biologia, biotechnologia) a także medycznych, stomatologicznych, farmaceutycznych i weterynaryjnych, pragnących zdobyć, poszerzyć i ugruntować wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów i nowoczesnych materiałów dla me- dycyny. Słuchacze zdobywają i/lub pogłębiają wiedzę z zakresu inżynierii biomateriałów. Po zakończeniu studiów wykazują się znajomością budowy, właściwości i sposobu otrzymywania materiałów przeznaczonych dla medycyny. Potrafią anali- zować wyniki badań i przekładać je na zachowanie się biomateriału w warunkach żywego organizmu. Ponadto słuchacze wprowadzani są w zagadnienia dotyczące wymagań normowych, etycznych i prawnych niezbędnych do wprowadzenia nowego materiału na rynek. Ukończenie studiów pozwala na nabycie umiejętności przygotowywania wniosków do Komisji Etycznych i doboru metod badawczych w zakresie analizy biozgodności materiałów.	
Zasady naboru: Termin zgłoszeń: od 20.09.2015 do 20.10.2015 (liczba miejsc ograniczona - decyduje kolejność zgłoszeń) Wymagane dokumenty: dyplom ukończenia szkoły wyższej Osoby przyjmujące zgłoszenia: Prof. dr hab. inż. Elżbieta Pamuła (tel. 12 617 44 48, e-mail: epamula@agh.edu.pl) Dr inż. Małgorzata Krok-Borkowicz (tel. 12 617 23 38, e-mail: krok@agh.edu.pl)	

 Czas trwania: 2 semestry (160 h)
 Opłaty: 2 600 zł

 8 zjazdów (soboty-niedziele) 1 raz w miesiącu
 Przewidywana data rozpoczęcia: 28.11.2015

•••••