

Agata GRUCA<sup>1,2</sup>

Barbara SZARANIEC<sup>3</sup>

Jacek LORKOWSKI<sup>4</sup>

Ireneusz KOTELA<sup>4,5</sup>

## **Kompozyty na bazie PLA modyfikowane dodatkami bioaktywnymi TCP i TiO<sub>2</sub>, przeznaczone na resorbowalne śruby interferencyjne**

**PLA/TCP composites with PLA/TiO<sub>2</sub> layers as a biomaterial for bioabsorbable interference screws**

<sup>1</sup>Międzywydziałowa Szkoła Inżynierii Biomedycznej, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Kierownik:

dr hab. inż. Piotr Augustyniak prof. AGH

<sup>2</sup>Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Dziekan Wydziału:

prof. dr hab. n. med. Stanisław Głuszek

<sup>3</sup>Wydział Inżynierii Materiałów i Ceramiki, Katedra Biomateriałów, Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie.

Kierownik Katedry:

prof. dr hab. inż. Jan Chłopek

<sup>4</sup>Klinika Ortopedii i Traumatologii, Centralny Szpital Kliniczny MSW, Warszawa.

Kierownik Kliniki:

prof. dr hab. n. med. Ireneusz Kotela

<sup>5</sup>Instytut Fizjoterapii, Uniwersytet Jana Kochanowskiego, Kielce.

Kierownik Instytutu:

prof. nadzw. dr hab. n. med. Ireneusz Kotela

Celem badań była analiza przydatności kompozytów na bazie polilaktydu z dodatkami fosforanu triwapnia i tlenku tytanu (IV) w perspektywie ich zastosowania do produkcji wielofunkcyjnych śrub interferencyjnych ulegających biodegradacji, wykazujących bioaktywność oraz posiadających działanie bakteriobójcze. Ocenie poddano próbki z czystego polilaktydu, z polilaktydu z siedmio- i dziesięcioprocentowym udziałem fosforanu triwapnia. Modyfikacje powierzchniowe wprowadzono nanosząc metodą zanurzeniową powłoki z dodatkiem tlenku tytanu (IV). Przeprowadzone zostały badania wytrzymałości kompozytów na rozciąganie, badania degradacji materiałów (ocena zmian pH płynów inkubacyjnych oraz ich mętności), a także analiza działania bakteriobójczego dodatku znajdującego się w powłoce. Proszki modyfikujące zobrazowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Potwierdzone zostało uwalnianie cząstek modyfikujących do środowiska oraz działanie antybakteryjne tlenku tytanu (IV). Naniesienie powłoki znacznie obniża wytrzymałość mechaniczną materiałów, w związku z czym konieczne jest udoskonalenie metod otrzymywania kompozytów w celu jej podwyższenia oraz ujednorodnienia mikrostruktury materiałów.

### **Wstęp**

Śruby interferencyjne umożliwiają umocowanie przeszczepu BPTB (bone-pattellar-tendon-bone) lub przeszczepu pobranego ze ścięgna mięśnia półścięgnistego i mięśnia smukłego w kanale kostnym podczas rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego (ACL) [1]. Typ oraz materiał z jakiego wykonany jest implant mocujący przeszczep jest jednym z czynników decydujących o powodzeniu rekonstrukcji ACL. Obecnie widoczna jest znaczna przewaga stosowania śrub interferencyjnych wykonanych z polimerów nad śrubami z materiałów metalicznych. Pomimo gorszych właściwości materiałów polimerowych w porównaniu do metali, odpowiednia konstrukcja implantu pozwala zapewnić lepszą biofunkcyjność [2]. Materiałami najczęściej stosowanymi do produkcji śrub interferencyjnych są kompozyty na bazie polimerów resorbowalnych, takich

The aim of the tests was to evaluate the usability of polylactic acid (PLA) composites with the addition of titanium (IV) oxide (TiO<sub>2</sub>) and calcium trioxide (TCP) to produce multifunctional bioabsorbable and bioactive interference screws with antibacterial properties. The analyses were conducted on the samples made of PLA, PLA with 7% TCP and PLA with 10% TCP. Besides, the samples were coated with a layer of PLA with TiO<sub>2</sub>. The degradation (pH and incubation fluids turbidity), tensile strength of these materials and antibacterial activity have been evaluated. Transmission electron microscopy was used to illustrate modifying particles. The tests confirmed, that TiO<sub>2</sub> and TCP particles are released from the implant and that TiO<sub>2</sub> layer has an antibacterial effect. Samples with coatings has significantly lower tensile strength, what indicates the need of improving the process of producing with the purpose of obtaining a homogeneous microstructure.

jak poli-L-laktyd PLLA, poli-DL-laktyd PDLLA, poliglikolid PGA i kopolimery PDLLA i PGA z dodatkami bioaktywnymi w postaci fosforanów wapnia (fosforan triwapnia, hydroksyapatyt lub dwufazowe mieszaniny tych związków) [3]. Powikłaniem, które może pojawić się nawet po poprawnie przeprowadzonej rekonstrukcji mogą być zakażenia bakteryjne.

Celem pracy jest opracowanie materiału przeznaczonego na wielofunkcyjny implant, który oprócz biofunkcyjności posiadałby właściwości bakteriostatyczne lub bakteriobójcze.

### **Materiał i metodyka**

#### **I. Materiał poddany analizie**

Do przygotowania próbek wykorzystano polilaktyd PLLA 3251D Ingeo firmy NatureWorks LLC. Bioaktywnym składnikiem modyfikującym był fosforan triwapnia (TCP) w postaci pro-

### **Słowa kluczowe:**

śruby interferencyjne, biomateriały kompozytowe, rekonstrukcja ACL

### **Key words:**

interference screws, composite biomaterials, ACL reconstruction

Adres do korespondencji:

Agata Gruca

ul. Nowa 23

33-370 Muszyna

e-mail: ag.gruca@gmail.com

szku o rozmiarach mikrometrycznych, wyprodukowany przez firmę Sigma-Aldrich. Składnikiem bakteriobójczym był  $\text{TiO}_2$  - tlenek tytanu (IV) firmy SojuzChimexport.

W celu przeprowadzenia badań właściwości fizyko-mechanicznych materiałów przeznaczonych na resorbowalne śruby interferencyjne, przygotowano próbki polimerowe i kompozytowe w kształcie wioseł (wg normy PN-EN ISO 527-2) z polilaktydu z różnymi udziałami wagowymi TCP. Następnie na otrzymane próbki naniesiono powłoki z dodatkiem  $\text{TiO}_2$ .

Przygotowane mieszanki PLA z 7% i 10% udziałem wagowym TCP suszono przez 2h w temperaturze  $60^\circ\text{C}$ , a następnie wtryskiwano wiośla wykorzystując wtryskarke jednoślismakową Multiplas (temp. wtrysku  $165^\circ\text{C}$ ).

Powłoki z dodatkami bakteriobójczymi nanoszono zanurzając wiośla wykonane z PLA i kompozytów PLA/TCP w roztworze polilaktydu w dichlorometanie z 20% dodatkiem  $\text{TiO}_2$ . Tak wysokie udziały zostały zastosowane, aby ułatwić ocenę głębokości wnikania dodatków bakteriobójczych do wnętrza próbki. Powłoki nanoszono poprzez jednokrotne zanurzenie wiośla w roztworze na czas ok. 5s.

Do badań działania bakteriobójczego przygotowano próbki o średnicy ok. 12mm. Do formy na krążki wtryskiwano polilaktyd (próbka odniesienia) oraz polilaktyd z 10% udziałem wag.  $\text{TiO}_2$ .

## II. Kolejne etapy analizy materiału

### 1) Transmisyjna mikroskopia elektronowa

W celu scharakteryzowania cząstek TCP i  $\text{TiO}_2$  poddano je obserwacjom z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEOL - JEM1011). Cząstki pobierano z zawiesin w wodzie destylowanej po uprzednim ich ujednorodnieniu przy użyciu mieszadła ultradźwiękowego.

### 2) Badania degradacji materiałów w warunkach in vitro

W celu oceny degradacji materiałów, przeprowadzono ośmiotygodniową inkubację wioseł w wodzie destylowanej. Na każdy z trzech okresów badawczych (2,4,8 tygodni) przeznaczono po trzy wiośla wykonane z PLA z powłoką z  $\text{TiO}_2$ , PLA z 7% udziałem wag. TCP z powłoką z  $\text{TiO}_2$  i PLA z 10% udziałem wag. TCP z powłoką z  $\text{TiO}_2$ . Próbki inkubowano w wodzie destylowanej w temp.  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Do pomiaru pH płynów inkubacyjnych wykorzystano pH-metr CP-315 (Elmetron) z dokładnością 0,01. Pomiary wykonano w pierwszym, piątym i siódmym dniu inkubacji, a następnie wykonywano co tydzień.

Badania mętności płynów inkubacyjnych (woda destylowana), w których przetrzymywano materiały przeprowadzono przy użyciu urządzenia 2100 AN IS Laboratory Turbidimeter firmy Hach. Zmierzona mętność płynów inkubacyjnych wyrażona jest w jednostce NTU (nefelometryczna jednostka mętności).

### 3) Badania wytrzymałości materiałów na rozciąganie

Wytrzymałość materiałów wyznaczano w statycznej próbie rozciągania przy użyciu uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435. Prędkość rozciągania wynosiła 20 mm/min. Badaniu poddano wiośla po inkubacji i wiośla wyjściowe, dla każdego typu materiałów wykonując po 3 pomiary.

### 4) Badania działania bakteriobójczego

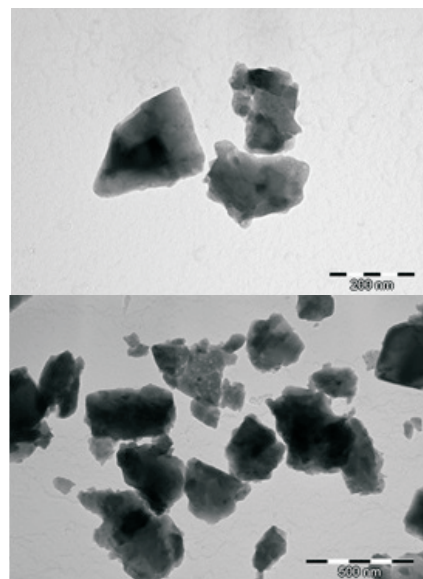
Badania działania bakteriobójczego dla materiałów z dodatkiem  $\text{TiO}_2$  przeprowadzone zostały w Zakładzie Bakteriologii i Biologii Molekularnej w Katedrze Nauk Przedklinicznych na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Wykonano trzy doświadczenia. We wszystkich stosowano zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 w skali MacFarlada. Analizy bakteriobójczości przeprowadzono wobec następujących szczepów:

- *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej)
- *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty)
- *Staphylococcus aureus* MRSA (gronkowiec złocisty metycylinooporny)
- *Staphylococcus pseudintermedius*

Pierwszym doświadczeniem było zatapianie krążków w pożywce z analizowanymi koloniami bakterii. Krążki umieszczone na szalkach Petriego zalane zostały pożywką Mueller Hinton Agar, której temperatura wynosiła  $45^\circ\text{C}$ . W pożywce znajdował się określony szczep bakteryjny w ilości 0,1ml zawiesiny bakterii na 20ml pożywki. Próbki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w warunkach aerobowych. Po 24h oraz po zakończeniu inkubacji analizowano strefy zahamowania wzrostu mikroorganizmów wokół krążków. Powyższe badanie wykonano po trzy razy dla każdego szczepu i każdej próbki.

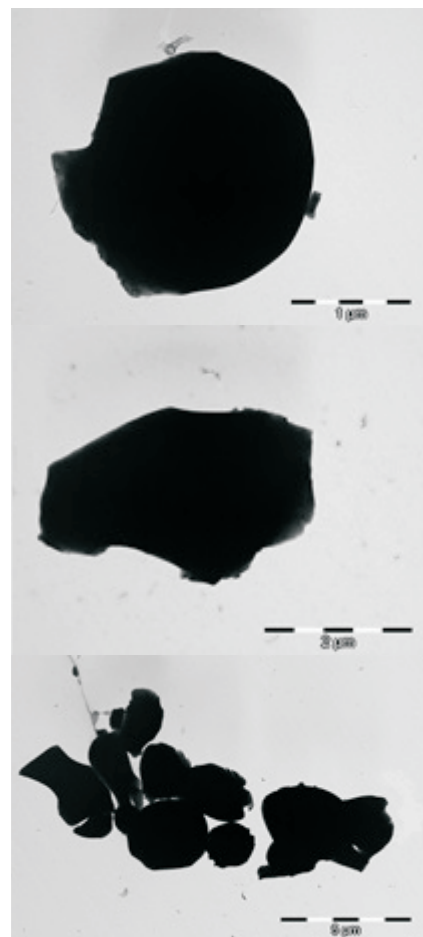
## Wyniki

**I. Obrazowanie cząstek modyfikujących w transmisyjnej mikroskopii elektronowej.** Na zdjęciu 1 przedstawiono obraz cząstek TCP. Kształt cząstek jest nieregularny, a ich średni wymiar wynosi ok. 200-400nm. Cząstki są od siebie oddzielone.



Zdj.1  
Obraz cząsteczek TCP uzyskany za pomocą mikroskopu TEM.

Na zdjęciu 2 przedstawiono cząstki  $\text{TiO}_2$ . Średnica cząstek jest o rząd wielkości większa niż dla TCP i wynosi około 2-4 $\mu\text{m}$ . Widoczne jest zróżnicowanie ich kształtu.



Zdj.2  
Obraz cząsteczek  $\text{TiO}_2$  uzyskany za pomocą mikroskopu TEM.

## II. Badania degradacji materiałów

### 1) Pomiary pH

Pomiary pH i przewodności przeprowadzono w celu oceny kinetyki uwalniania produktów degradacji do środowiska. Dla wszystkich materiałów, zarówno polimerowych (PLA), jak i kompozytowych (PLA/TCP) modyfikowanych powierzchniowo tlenkiem tytanu (IV) odczyn nie ulega znacznym zmianom i pH ma wartość 5,5-6,5 (ryc. 1).

### 2) Mętność

W celu oceny intensywności uwalniania dodatków bakterioobójczych i bioaktywnych z materiałów podczas inkubacji przeprowadzono analizę mętności płynów inkubacyjnych. Wyniki badań przedstawiono na rycinie 2.

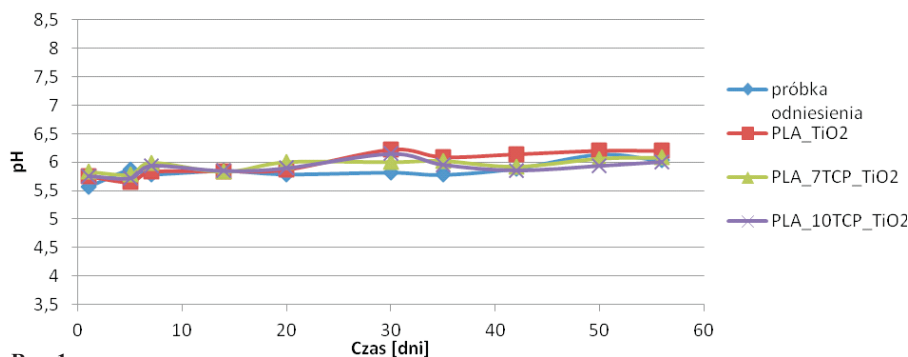
Mętność płynu po ośmiotygodniowej inkubacji wioseł z czystego PLA jest tego samego rzędu, co mętność płynu odniesienia (woda destylowana). Oznacza to, że sam polimer ma pomijalny wpływ na wynik badań. Zmiany mętności obserwuje się w przypadku zastosowania TCP i  $TiO_2$ . Analizowany parametr wzrasta przy naniesieniu na wiośło PLA powłoki z dodatkiem. Zastosowanie 7% i 10% dodatku TCP powoduje dalszy wzrost – odpowiednio o 341 i 269%. Przy dodatku 10% TCP mętność płynu jest mniejsza niż w przypadku 7% TCP.

## III. Badania wytrzymałości materiałów na rozciąganie

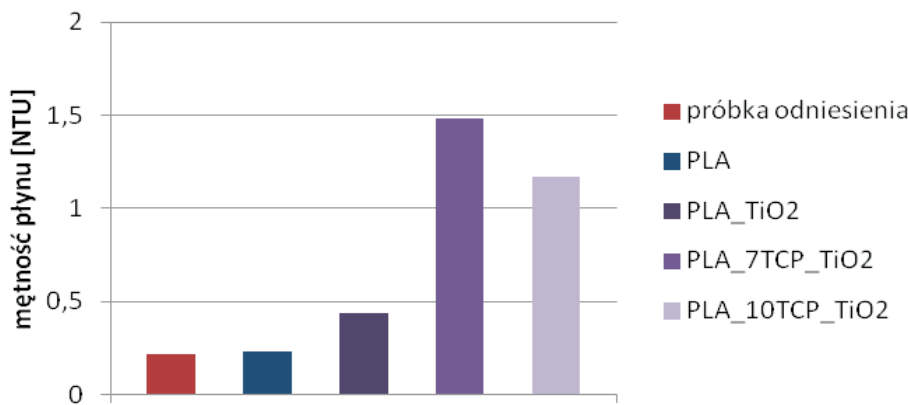
Przeprowadzono analizę wpływu procentowego udziału wagowego TCP oraz obecności powłoki z dodatkiem  $TiO_2$  na wytrzymałość materiału. Zmierzone wartości  $R_m$  dla wioseł wyjściowych (bez inkubacji) z dodatkami TCP i powłokami oraz odchylenia standardowe zestawiono na wykresie (ryc. 3).

Kolejną przeprowadzoną analizą było porównanie wpływu czasu inkubacji próbek z naniesionymi powłokami na ich wytrzymałość na rozciąganie. W tym celu, przy użyciu maszyny wytrzymałościowej zbadano wszystkie próbki inkubowane. Wyniki eksperymentu przedstawiono na wykresie (ryc. 4)

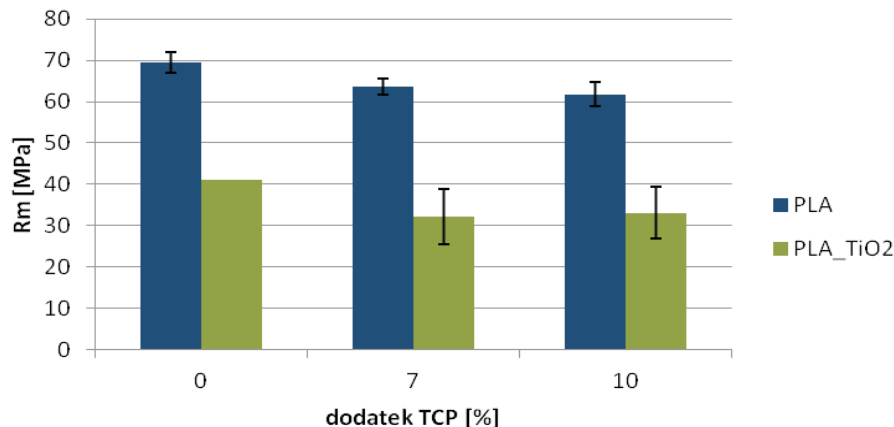
Przed inkubacją, największą wytrzymałość wykazują wiośła polimerowe bez TCP, natomiast już po dwóch tygodniach zauważyć można znaczny wzrost  $R_m$  dla materiałów, w których ten dodatek zastosowano. W dalszych tygodniach przebywania próbek w środowisku wodnym ich wytrzymałość spada, co najlepiej widoczne jest w przypadku próbki polilaktydowej z powłoką z  $TiO_2$ .



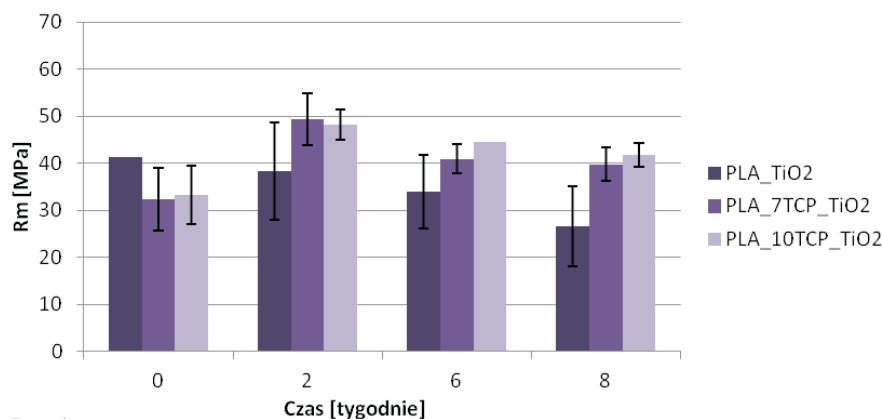
Ryc. 1. Zmiany pH podczas inkubacji wioseł PLA oraz PLA/TCP modyfikowanych powierzchniowo  $TiO_2$ .



Ryc. 2. Mętność płynów inkubacyjnych po 8 tygodniach (materiały z powłoką z  $TiO_2$ ).



Ryc. 3. Wytrzymałość na rozciąganie dla materiałów z 0%, 7% i 10% udziałem TCP i powłokami z  $TiO_2$ .



Ryc. 4. Wytrzymałość na rozciąganie próbek z powłoką z  $TiO_2$ , przed, w 2, 6 i 8 tygodniu inkubacji

#### IV. Badania działania bakterio-bójczego

Wyniki badania działania bakterio-bójczego dla próbki wykonanej z polilaktydu oraz dla próbki z dodatkiem tlenku tytanu (IV) przedstawiono w tabeli I.

#### Dyskusja

Materiały stosowane do produkcji resorbowalnych śrub interferencyjnych powinny ulegać resorpcji w czasie równoległym z zarastaniem kanału kostnego, tak aby zapewnić prawidłowe utrzymanie przeszczepu. Częstki uwalniające się w trakcie degradacji powinny być metabolizowane w organizmie, nie mogą natomiast zaburzać równowagi środowiska wewnętrznego. Istotna jest także jednorodność struktury kompozytu, która wpływa na jednorodność jego właściwości mechanicznych i bioaktywnych.

Zobrazowane przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego cząstki fosforanu triwapnia nie tworzą aglomeratów. Na tej podstawie przypuszczać można, że również w objętości próbki będą one równomiernie rozmieszczone, co korzystnie wpływa na jednorodność struktury materiału.

Polilaktyd jest polimerem o dobrze poznanych właściwościach, powszechnie stosowanym do produkcji implantów ortopedycznych, ulegającym degradacji w organizmie [4,5]. Zaletą stosowania resorbowalnych materiałów syntetycznych jest możliwość dostarczania przez nie leków i substancji wspomagających zrost kostny [6,7,8]. Próbki wykonane z badanych kompozytów tego polimeru degradują nie zmieniając pH płynu inkubacyjnego podczas ośmiotygodniowej inkubacji. Z objętości oraz powierzchni próbek uwalniane są cząstki modyfikujące (TCP, TiO<sub>2</sub>), które zwiększają mętność płynu. Zastosowana metoda nie umożliwia pomiaru ilościowych udziałów poszczególnych cząstek. W celu dokładnej oceny stopnia uwalniania, należałoby przeprowadzić dodatkowe analizy ilościowe.

Badania wytrzymałości na rozciąganie materiałów przeznaczonych na śruby interferencyjne pozwoliły na ocenę wpływu dodatków modyfikujących oraz wpływu inkubacji na właściwości mechaniczne. Otrzymanie materiału o wysokiej wytrzymałości, jest istotne ze względu na warunki mechaniczne, w jakich swoje funkcje spełniać ma implant. Bardzo ważna jest także jak najmniejsza utrata wytrzymałości na rozciąganie w czasie po implantacji, dlatego też oprócz próbek wyjściowych badano wiośła poddane inkubacji.

**Tabela I.**  
**Działanie bakterio-bójcze próbek z dodatkiem TiO<sub>2</sub>**

Analizowany szczep bakterii	Działanie hamujące wobec szczepu bakterii	
	Próbka odniesienia (PLA)	Próbka PLA z 10% udziałem TiO <sub>2</sub> - ilość powtórzeń
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	brak	1/3
<i>Staphylococcus aureus</i> (gronkowiec złocisty)	brak	2/3
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (gronkowiec złocisty, szczep metycylinoodporny)	brak	brak
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (paleczka ropy błękitnej)	brak	brak

Z przeprowadzonych pomiarów jednoznacznie wynika, że dodatek objętościowy TCP oraz naniesienie powłoki zmniejszają wytrzymałość materiałów na rozciąganie. Zdecydowanie bardziej znaczący jest wpływ obecności powłok z dodatkiem TiO<sub>2</sub>. Dla próbki z 7% TCP różnica ta wynosi ok. 41%, a z 49% TCP - ok. 46%. Różnice pomiędzy wytrzymałościami wioseł z powłokami z różnymi dodatkami TCP są niewielkie.

Wytrzymałość próbek na rozciąganie podczas inkubacji ulega obniżeniu. Największą stabilność parametru R<sub>m</sub> zaobserwowano w próbkach z 10% udziałem TCP. W perspektywie zastosowania tego materiału na śruby interferencyjne, jest to zjawisko bardzo korzystne, ze względu na konieczność utrzymania parametrów mechanicznych implantu przez cały czas niezbędny do integracji więzadła z kością.

Z przeprowadzonych analiz wynika, że obecność dodatków, zarówno w objętości kompozytu jak i w powłoce zmniejsza wytrzymałość materiałów wyjściowych na rozciąganie. Naniesienie powłoki, wpływa jednak na obniżenie parametru R<sub>m</sub> w większym stopniu, niż dodatek TCP. W przypadku inkubacji próbek dochodzi do umocnienia materiału i zwiększenia jego wytrzymałości po dwóch tygodniach inkubacji, następnie wytrzymałość spada. Zjawisko to wynikać może z umocnienia polimeru spowodowanego uporządkowaniem jego struktury podczas inkubacji. Ze wszystkich wioseł z naniesionymi powłokami najkorzystniej zachowują się materiały z 10% udziałem TCP, których wytrzymałość nie maleje w tak znaczącym stopniu, jak w przypadku innych próbek.

Potwierdzone zostało udowodnione wcześniej [9,10] antybakteryjne działanie tlenku tytanu (IV). Tlenek tytanu (IV) posiada także działanie bioaktywne [11].

#### Wnioski

1. Otrzymane materiały nie zmieniają parametrów środowiska w znacznym stopniu. Cząstki modyfikujące uwalniane są do otoczenia, co stwierdzono obserwując zwiększoną mętność płynów inkubacyjnych po ośmiotygodniowej inkubacji.

2. Naniesienie powłok z dodatkiem TiO<sub>2</sub> powoduje znaczne obniżenie wytrzymałości materiałów na rozciąganie (ok.40%). Po pierwszych dwóch tygodniach zaobserwowano wzmocnienie próbek z dodatkiem TCP.

3. Konieczne jest udoskonalenie metody otrzymywania kompozytów, w celu podwyższenia ich wytrzymałości mechanicznej oraz ujednorodnienia mikrostruktury.

#### Piśmiennictwo

1. **McDermott ID.** Graft options for reconstructive surgery. *Orthopaedics and Trauma* 2013; 27:3; 156-163.

2. **Suchenski M, McCarthy M, Chowaniec D, Hansen D, McKinnon W, Apostolakis J, Arciero R, Mazzocca A.** Material Properties and Composition of Soft-Tissue Fixation. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2010; 26; 821-831.

3. **Konan S, Haddad FS.** A clinical review of bioabsorbable interference screws and their adverse effects in anterior cruciate ligament reconstruction surgery. *The Knee* 2009; 16: 6-13.

4. **Gaurava S, Ankita M, Pradeep S.** Characterization and In Vitro degradation studies of Synthesized Polylactide (PLA). *Res J Chem Environ* 2012; 16: 14-21.

5. **Ambrose C, Clanton T.** Bioabsorbable Implants: Review of Clinical Experience in Orthopedic Surgery. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 1: 171-177.

- 6. Russias J, Saiz E, Nalla RK, Gryn K, Ritchie RO, Tomsia AP.** Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation. *Materials Science and Engineering* 2006; 26: 1289-1295.
- 7. Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A.** Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 585-591.
- 8. Hunt J, Callaghan J.** Polymer-hydroxyapatite composite versus polymer interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction in a large animal model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008; 16: 655-660.
- 9. Gupta K, Singh RP, Pandey A, Pandey A.** Photocatalytic antibacterial performance of TiO<sub>2</sub> and Ag-doped TiO<sub>2</sub> against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. *Beilstein J Nanotechnol* 2013; 4: 345-351.
- 10. Fu G, Vary PS, Lin CT.** Anatase TiO<sub>2</sub> Nanocomposites for Antimicrobial Coatings. *J Phys Chem B* 2005; 109: 8889-8898.
- 11. Oh S, Daraio LH, Pisanic TR, Finones RR, Jin S.** Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO<sub>2</sub> nanotubes. *J Biomed Mater Res* 2006; 78A: 97-103.