

# Lasikuituvahvistetun huokoisen luusementin biomineralisaatio

Mervi Puska<sup>1</sup>, Hanna Mark<sup>2</sup>, Allan J Aho<sup>2,3</sup>, Teemu Tirri<sup>2</sup>, Jukka Seppälä<sup>1</sup>, Pekka K Vallittu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Helsingin teknillinen korkeakoulu, Polymeeriteknologian laboratorio; <sup>2</sup>Turun yliopisto, Hammaslääketieteen laitos; <sup>3</sup>Ortopedian ja traumatologian klinikka, TYKS

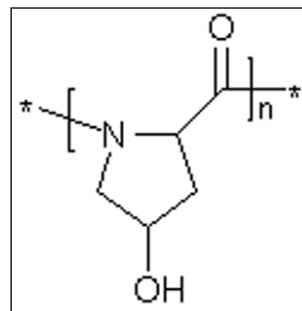
Acrylic bone cements are used to fix metal joint prostheses to bone. The main substance in acrylic bone cement is biologically inert poly(methylmethacrylate), PMMA. The dense PMMA polymer structure of cement does not allow bone ingrowth into cement. Therefore, the main focus of our studies is to modify acrylic bone cement in order to improve its biological and structural properties e.g., by creating porosity in the cement matrix. The porous structure is created in situ using pore-generating filler (i.e., 20 wt % of an experimental biodegradable polyamide) that is incorporated in acrylic bone cement. The aim of this in vitro study was to investigate the biomineralization of acrylic bone cement modified using an experimental biodegradable polyamide.

## Johdanto

Perinteisiä akryylisiä polymeerejä on käytetty luusementteinä lonkkaproteesien kiinnittämiseen jo neljän vuosikymmenen ajan (1). Polymetyylimetakrylaatin (PMMA) inertin ja tiiviin rakenteen vuoksi ne eivät kuitenkaan kiinnity biologisesti ympäröivään luuhun. Aiemmat tutkimuksemme ovat käsitelleet trans-4-hydroksi-L-proliinin polyamidia (20 paino-%) (huokoisuutta muodostava täyteaine, kuva 1) sisältävän akryylinen luusementin mekaanisia ominaisuuksia ja biologista käyttäytymistä (2, 3). Merkkejä luun kasvamisesta akryyliseen luusementtimatriisiin (kuva 2) on havaittu, kun luusementin joukkoon on lisätty huokosia muodostavaa täyteainetta (4). Tämän in vitro -kokeen tarkoitus oli tutkia 20 paino-%:n trans-4-hydroksiproliinin polyamidia sisältävän akryylinen luusementin biomineralisaatiota.

## Materiaalit ja menetelmät

Neljälle testiryhmälle valmistettiin luusementtimatriisit joko kaupallisesta PMMA-pohjaisesta luusementistä (Palacos®R, Schering-Plough, Heist-op-den-Berg, Belgia) tai 20 m-% huokoisuutta muodostavaa täyteainetta ja/tai 8 m-% E-lasikuituvahvistetta sisältävää Palacos®R:stä (taulukko 1). Lasikuitu oli PMMA-

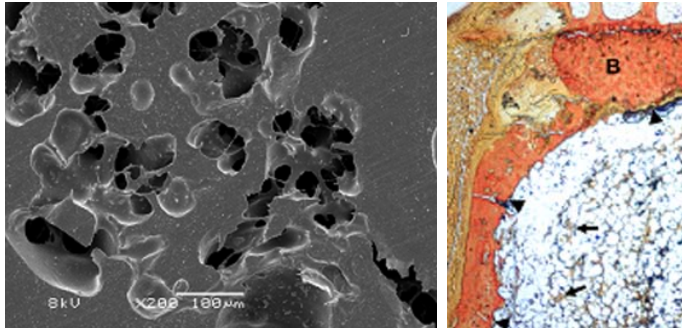


Kuva 1. Huokosia muodostavan täyteainemolekyylin rakenne. Molekyylillä on luonnossa esiintyvän 4-hydroksiproliinin biodegradable polyamidi.

Taulukko 1. Testiryhmät.

Ryhmä	N	Kuvaus
1	3	Palacos®R -luusementti (kontrolli)
2	3	Palacos®R -luusementti ja E-lasikuitusilppu (F+BC)
3	3	Palacos®R -luusementti ja huokosia muodostava täyteaine (PA+BC)
4	3	Palacos®R -luusementti, huokosia muodostava täyteaine ja E-lasikuitusilppu (PA+F+BC)

preimpregnoitu ja paloitetu 1 mm:n pituisiksi paloiksi (mineraalikoostumus: SiO<sub>2</sub> 54,5 %, CaO 22,9 %, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 14,2 %, Na<sub>2</sub>O 0,1 %, MgO 0,7 %, K<sub>2</sub>O 0,7 %, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 6,3 %)(Stick Tech Ltd, Turku, Suomi).



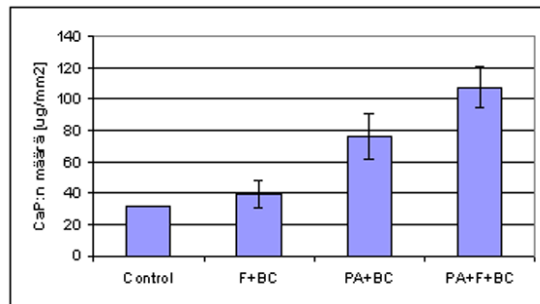
Kuva 2. SEM-kuvauksen perusteella vesisorp-tion tuloksena akryylyseen polymeerimat-riisiin, joka sisälsi huokosia muodostavaa täyteainetta, muodostui satunnaisesti jakautuneita huokosia (kuva vasemmalla). SEM-kuvassa mittauspalkin pituus on 100  $\mu\text{m}$ . Histologisessa arvioinnissa oli havaitta-vissa merkkejä luun kasvamisesta huokoisen luusementin sisään (kuva oikealla, nuolet). Nuolenpäät osoittavat luusementin ja luun (B) välistä kontaktipintaa.

Huokoisuutta muodostava, biohajoava polyamidi oli valmistettu trans-4-hydroksi-L-proliinista (5). Jokaista testiryhmää kohden tehtiin kolme rinnakkaista biomi-neralisaatiokoea.

Biominalisaatiokokeessa sementtisekoitenäyte-kiekot ( $\phi = 13,5 \text{ mm}$  ja  $h = 2,5 \text{ mm}$ ) käsiteltiin aikai-semmin kuvatulla tavalla (6). Mineraalikerros muo-dostettiin in vitro käyttäen bioaktiivista lasia (BAG) ja simuloitua kudostestettä (SBF). BAG:ia (tyyppi: S53P4, mineraalikoostumus:  $\text{SiO}_2$  53 %,  $\text{Na}_2\text{O}$  23 %,  $\text{CaO}$  20 %,  $\text{P}_2\text{O}_5$  4 %) (Vivoxid Ltd., Turku, Finland) käytettiin biomimeettisessä prosessissa sili-kan lähteenä. Lasi käytettiin jauheena, jonka partik-kelikoko oli  $<45 \mu\text{m}$ . SBF valmistettiin liuottamalla ionivaihdettuun veteen Na-, K-, Mg- ja Ca-suoloja (7). Sen pH säädettiin fysiologiseen pH-arvoon 7,40  $37^\circ\text{C}$ :ssa. Näytekappaleet upotettiin SBF-liuokseen, johon oli lisätty 30 mg BAG:ia ja annettiin olla se-koituksessa 7 päivän ajan ( $37^\circ\text{C}$ ). Tämän jälkeen ne pestiin ionivaihdetulla vedellä ja kuivattiin 24 h  $50^\circ\text{C}$ :ssa. Muodostuneen CaP:n määrä laskettiin massan kasvun, joka oli suhteutettu kuivan näytekappaleen biohajoamattomiin komponentteihin (PMMA ja E-lasikuidut), funktiona. Lisäksi massan kasvu jaettiin näytekiekon pinta-alalla. Mineraalikerroksen muo-dostuminen tutkittiin myös morfologisesti käyttä-en pyyhkäisyelektronimikroskooppia (SEM) (JEOL, Model JSM 5500, Tokyo, Japan). SEM-kuvausta var-ten näytteet pinnoitettiin kullalla (pinnoituksen pak-suus = 17 nm) sputterointilaitteella (Model BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater, Balzers, Liechtenstein).

## Tulokset

Biominalisaatiokokeessa laskettiin näytekappaleiden pinnalle muodostuneen CaP:n määrä ja voitiin todeta, että kaikkien näytekappaleiden massa kasvoi. Kaavios-ta 1 voidaan nähdä eri näyteryhmien pinnalle muo-dostuneen CaP:n määrä pinta-alaa kohden. Huokosia

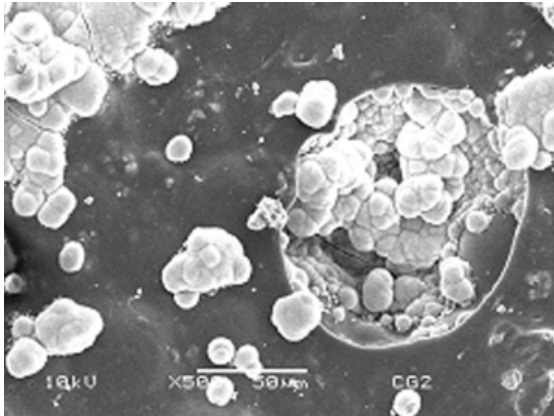


Kaavio 1. Näytteiden pinnalle muodostuneen CaP:n määrä laskettiin massa/pinta-ala:n kasvun funktiona.

muodostavaa täyteainetta eli 4-hydroksi-L-proliinin polyamidia sisältävien näytteiden CaP:n muodostus oli yli kaksi kertaa suurempi kuin pelkkää akryylystä luusementtiä sisältävien näytteiden (kontrolliryhmä). Lisäksi SEM-analysissä merkkejä mineraalikerrok-sen (hydroksiapatiitti) muodostumisesta havaittiin pääosin poly(4-hydroksi-L-proliini)amidin biohajoa-misen seurauksena syntyneissä huokosissa (kuva 3). Pelkän PMMA:n pinnalla sitä vastoin ei ollut havaitta-vissa yhtä paljon mineraalikerroksen muodostumista.

## Pohdinta

Käytettäessä perinteistä akryylystä luusementtiä ei synny kudostaktia luun ja sementtikerroksen välille, interfaceen (8). Tästä johtuen proteesi, joka on kiin-nitetty akryylysen luusementin avulla, pysyy kiinni ympäröivässä luukudoksessa vain mekaanisesti (an-choring effect). Heikko kiinnittyminen johtaa mik-roliikeen, periprosteettisen sidekudosärsytyksen/tu-lehdusreaktion kautta lopuksi proteesin irtoamiseen (9,10). Luun ja implantin välistä kiinnittymistä voi-daan parantaa muokkaamalla akryylysen luusemen-tin rakenteellisia ominaisuuksia esimerkiksi lisäämällä luusementtiin bioaktiivisia komponentteja tai luomal-la in situ -huokoisuutta polymeerimatriisiin. In vivo -tutkimuksissamme on havaittu merkkejä luun kas-



Kuva 3. Biomineerattuihin huokosiin apatiittikerroksen muodostumisen poly(4-hydroksi-L-proliini)amidin biohajoamisen tuloksena syntyneisiin huokosiin. SEM-kuvassa mittauspalkin pituus on 50 µm.

vamisesta akryyliseen luusementtiin (4). Aikaisempien in vitro suoritettujen tutkimustemme mukaan huokosia muodostavan täyteaineen lisääminen akryyliseen luusementtiin sai aikaan huokoisen rakenteen (kuva 2). Rakenteen modifioinnin aikaansaama mekaanisten ominaisuuksien heikkeneminen voidaan tiettyyn pisteeseen asti kompensoida kuituvahvisteiden ja lomittaisverkostorakenteen avulla (engl. semi-interpenetrating polymer network, semi-IPN). Lomittaisverkostorakenne saadaan aikaan lisäämällä sementtiin pieni määrä verkkorakenteen muodostavaa monomeeriä (2,3). Huokosia muodostava täyteaine – tässä työssä poly(4-hydroksi-L-proliini)amidi – liukenee nopeasti simuloidun kudoksen veteen jättäen polymeerimatriisiin tyhjiä aukkoja (kuvat 2 ja 3). Tässä biomimeettisessä mineralisaatiokokeessa luusementti, johon oli lisätty 20 paino-% poly(4-hydroksi-L-proliini)amidia sai aikaan enemmän mineraalin muodostumista näytteen pinnalle kuin luusementti, jossa huokoisuutta muodostavaa täyteainetta ei ollut (kuva 3). Pinta-alan kasvaminen voi selittää suuremman CaP:n määrän muodostumisen. Toisaalta pinta-alan kasvaminen ei yksinään selitä suurempaa CaP:n määrää huokoisissa rakenteissa, sillä mineralisaatioefekti (painonlisäys) oli suurin ryhmässä, joka sisälsi sekä poly(4-hydroksi-L-proliini)amidia että E-lasikuitua. Mineraalikerroksen syntyä ohjataan poly(4-hydroksi-L-proliini)amidin liukeneminen ja E-lasikuidut yhdessä. Tästä johtuen poly(4-hydroksi-L-proliini)amidin ja E-lasikuidun tuoma mahdollista osteokonduktiivisuutta tulisi tutkia tarkemmin.

## Loppupäätelmä

Biomineerattuihin huokosiin apatiittikerroksen muodostamisella täyteaineella muokattu akryylinen luusementti osoitti merkkejä mineraalikerroksen (hydroksiapatiitti) muodostumisesta luusementtimatriisin pinnalle. Luun omassa mahdollisuuden kasvaa myös sisälle sementin huokoisrakenteeseen interfacessa on tällä mekanismilla mahdollisuuksia aikaansaada parempaa biologista kiinnittymistä luusementin ja luukudoksen välille.

## Kirjallisuus

- Charnley J: Anchorage of femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 1960;42-B:28-30.
- Puska MA, Lassila LV, Närhi TO, Yli-Urpo AUO, Vallittu PK: Improvement of mechanical properties of oligomer-modified acrylic bone cement with glass-fibers. *Appl Compos Mater* 2004;11:17-31.
- Puska MA, Närhi TO, Aho AJ, Yli-Urpo AUO, Vallittu PK: Flexural properties of crosslinked and oligomer-modified glass-fibre reinforced acrylic bone cement. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:1037-1043.
- Puska MA, Aho AJ, Tirri T, Yli-Urpo AUO, Vaahtio M, Vallittu PK: Glass fibre reinforced porous bone cement implanted in rat tibia or femur. Histological and histomorfometric analysis. *Bioceramics* 2005;809-812.
- Puska MA, Yli-Urpo AUO, Vallittu PK, Airola K: Synthesis and characterization of polyamide of trans-4-hydroxy-L-proline used as porogen filler in acrylic bone cement. *J Biomater Appl* 2005;19:287-301.
- Väkiparta M, Forsback A-P, Lassila LV, Jokinen M, Yli-Urpo AUO, Vallittu PK: Biomimetic mineralization of partially bioresorbable glass fiber reinforced composite. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:873-879.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research* 1989;24:721-734.
- Freeman MA, Bradley GW, Revell PA: Observations upon the interface between bone and polymethylmethacrylate cement. *J Bone Joint Surg Br* 1982;64-B:489-493.
- Sabokbar A, Fujikawa Y, Murray DW, Athanasou NA: Radioopaque agents in bone cement increase bone resorption. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79-B:129-134.
- Santavirta S, Xu JW, Hietanen J, Ceponis A, Sorsa T, Kontio R, ym.: Activation of periprosthetic connective tissue in aseptic loosening of total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res* 1998;352:16-24.