

## Biohajoavan SR-PLA70-sauvan lujuuden säilyminen ja ominaisuudet rotan reiden osteotomiassa. Kokeellinen tutkimus.

Antti Joukainen \*, Harri Pihlajamäki \*\*, E. Antero Mäkelä \*, Nureddin Ashammakhi \*\*, Janne Viljanen \*\*, Hannu Pätiälä \*\*, Minna Kellomäki \*\*\*, Pertti Törmälä \*\*\*, Pentti Rokkanen \*\*

\* Kirurgian klinikka, KYS, \*\* Ortopedian ja traumatologian toimiala, HUS, \*\*\* Biomateriaalilaboratorio, Tampereen teknillinen korkeakoulu

Self-reinforced poly-L-DL-lactic acid 70:30 (SR-PLA70) composite rods, (2 mm by 26 mm) were implanted in the dorsal subcutaneous tissue of 16 rats. Osteotomies of the distal femur were fixed with SR-PLA70 composite rods (2 mm by 15 mm) in 39 rats. The follow-up times varied from one week to one year. After sacrifice three-point bending and shear tests were performed for subcutaneously placed rods, and radiological, histological, histomorphometrical, microradiographic, and oxytetracycline-fluorescence studies of osteotomized and intact control femora were performed. At 52 weeks the shear strength and flexural modulus of the rods were 41 per cent of the initial value, and the flexural strength was 43 per cent of the initial value. In the osteotomies seven specimens had to be excluded due to postoperative infection or dislocation of the fragment. Six of the 32 evaluated osteotomies showed signs of postoperative infection. Twenty-six osteotomies healed uneventfully. No signs of inflammatory or foreign-body reaction were observed. The present investigation demonstrated that the mechanical strength and fixation properties of the SR-PLA70 rods are suitable for fixation of cancellous bone osteotomies in rats.

Polylaktidin (PLA) enantiomeerien (L-laktidi ja D-laktidi) osuutta muuttamalla voidaan polylaktidin hajoamista in vivo säädellä. Tässä tutkimuksessa käytetty poly-L/DL-laktidi 70:30 (PLA70) hajoaa ja menettää lujuutensa nopeammin kuin L-laktidi.

Itselujittumistekniikalla (self-reinforcing, SR) valmistetun polylaktidin lujuus on olennaisesti suurempi kuin tavanomaisen PLA:n [1,2], ja riittää hyvin hohkaluun kiinnitykseen [3].

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää SR-PLA70-sauvan lujuuden säilyminen ja soveltuminen rotan reisiluun osteotomian kiinnitykseen.

### Aineisto ja menetelmät

Työhön käytetyt SR-PLA70-sauvat valmistettiin Tampereen teknisen korkeakoulun Biomateriaalilaboratoriossa käyttäen die drawing -tekniikkaa [2]. Gammasteriloitujen SR-PLA70-sauvojen läpimitta oli 2,0 mm ja pituudet 15 ja 26 mm.

Tutkimuksessa leikattiin yleisanestesiassa yhteensä 55 Wistar-rottaa, joista 16 mekaanisia tutkimuksia ja 39 osteotomiaa varten.

16 rotalle asetettiin kullekin 4 SR-PLA70-sauvaa eri viilloista selän ihonalaiskudokseen. Leikkauksen jälkeen rottia seurattiin 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ja 52 viikkoa. Lopetuksen jälkeen sauvat poistettiin selästä tutkimuksia varten.

Sauvat tutkittiin kolmen pisteen vääntökokeella ja leikkauslujuuskokeella Instron 4411 -laitteella (Instron plc, High Wycombe, UK). Taivutusominaisuudet laskettiin seuraavista kaavoista: taivutuslujuus:  $\sigma = 8F_m L / \pi D^3$  ja taivutusmodulus:  $E_b = 4L^3 m / 3\pi D^4$ . Leikkauslujuus laskettiin kaavasta:  $\tau = 2F_m / \pi D^2$

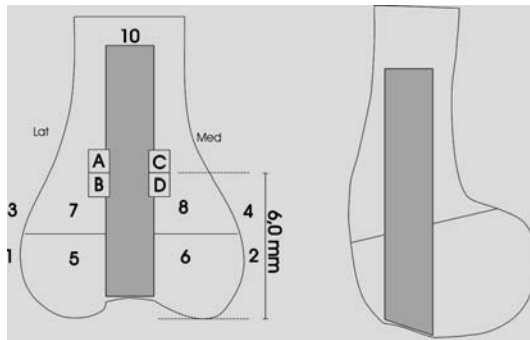
Näytteiden lämpökäyttäytyminen tutkittiin DSC -kalorimetrialla. Mm. lasittumislämpötila ( $T_g$ ), kylmä kiteytymislämpötila ( $T_c$ ), kiehumispisteen huippuarvo ( $T_m$ ) rekisteröitiin. Mahdollinen kiteytyminen in vivo kokeen aikana tutkittiin.

Sauvojen pinta- ja poikkileikkeet tutkittiin pyyhkäisyelektronimikroskopiolla.

39 rotalle tehtiin oikean polven anterolateraalisesta avauksesta reisiluun osteotomia ja kiinnitys 15 mm pituisella SR-PLA70-sauvalla (Kuva 1). Leikkauksen jälkeen rotat saivat käyttää leikattua raajaa, ulkoista tuentaa ei käytetty. Rottia seurattiin 1, 3, 6, 12, 24, 36, 4 ja 52 viikkoa;

kussakin seurantaryhmässä oli 5 rottaa, paitsi 4 rottaa sisältäneessä 1 viikon ryhmässä. 2 päivää ennen suunniteltua lopetusta rotille annettiin uudisluuon värjäävää oksitetrasykliiniä 50 mg/kg (4). Osteotomioiden parantuminen arvioitiin radiologisesti, histologisesti, mikroradiografisesti ja oksitetrasykliinifluoresenssitutkimuksella. Leikkaamaton vasen reisiluu toimi kontrollinäytteenä.

Puoliautomaattista kvantitatiivista histomorfometriaa varten mikroskooppi yhdistettiin videokameran kautta tietokoneeseen. Analyysiohjelman (AnalySIS Pro 3.00) avulla tutkittiin metafyyseistä 4 0,89 mm<sup>2</sup> kenttää (Kuva 1), joista määritettiin histomorfometriset muuttujat (trabekulaarisen luun tilavuusosuus, osteoidipinnan osuus trabekulaarisen luun pinnasta, aktiivisen osteoidia muodostavan pinnan osuus trabekelien pinnasta).



Kuva 1. Rotan distaalisen reisiluun malli ap- ja sivusuunnasta. Kuvaan merkitty osteotomia, SR-PLA70-sauva, neljä histomorfometrian näytealuetta (A-D) ja kymmenen oksitetrasykliinitutkimuksen näytealuetta (1-10).

OTC-tutkimuksessa reisiluut tutkittiin fluoresenssimikrospialla arvioiden erikseen luukalvon alaista aluetta, luun sisäistä osaa lähellä sauvaa, luun sisäistä osaa lähellä osteotomiaa ja sauvan proksimaalipuolella olevaa luuta (Kuva1).

Yksisuuntaista varianssianalyysiä käytettiin histomorfometristen muuttujien alustavassa ajasta riippuvien erojen tilastollisessa arvioinnissa. Lopullisessa analyysissä käytettiin regressioanalyysiä ja parillista t-testiä. OTC-fluoresenssitutkimusta varten käytettiin Wilcoxonin testiä.

## Tulokset

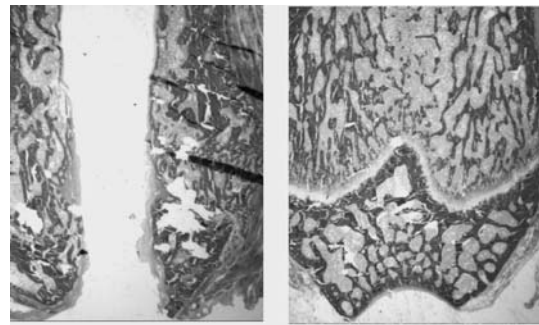
55 rottaa leikattiin. Mekaanisia ominaisuuksia tutkivan kokeen 16 rotasta yhdelläkään ei ollut komplikaatioita. 39 rotalle tehtiin osteotomia-kiinnitys ja seitsemän suljettiin pois infektion (5

rottaa), kiinnityksen pettämisen (1) ja osteolyysistä johtuvan puuttuvan kondyylin (1) vuoksi.

## Mekaaniset ja materiaalikokeet

Lähtövaiheen leikkauslujuus oli 120,9±1,5 MPa ja taivutuslujuus 214,1±4,2 MPa, ja taivutusmoduli 6,0±0,5 GPa. 52 vkon kohdalla leikkauslujuus ja taivutusmodulus olivat molemmat 41 prosenttia lähtöarvosta ja taivutuslujuus oli 43 prosenttia lähtöarvosta.

SR-PLA70 oli alkuvaiheessa täysin amorfista ja lasittumislämpötila (T<sub>g</sub>) 60°C. Polymeeri kiteytyi hieman in vivo.



Kuva 2. Mikroskooppikuva reisiluusta kuusi viikkoa osteotomian jälkeen. Osteotomia on lujittunut. Oikealla kontrollipuoli. (Värjäys Masson & Goldner, suurennos 50X).

Elektronimikropiassa todettiin ensimmäiset hajoamisen merkit SR-PLA70-sauvojen pinnalla 24 viikon jälkeen in vivo. 52 viikon kohdalla pinnallinen kerros oli kuoriutunut täysin pois ja rakenteen haurastuminen oli edennyt.

## Radiologinen, histologinen ja mikroradiografinen tutkimus

1-3 vkon näytteissä osteotomiat voitiin nähdä. Kolmen viikon kohdalla todettiin radiologisesti selvä kallus ja histologisesti vahva endostealinen ja periostealinen uudisluu muodostus osteotomia-alueella. Sauvojen ympärillä nähtiin ohut granulaatiokudoksen hyöhyke. Jättisolukertymiä ei todettu.

Kuuden viikon kohdalla radiologinen kallus oli vähentynyt. Histologisesti neljä viidestä osteotomiasta näytti luutuneen (Kuva 2). Ulkoisen kalluksen määrä oli lisääntynyt ja myös sauvojen ympärille oli kehittynyt uudislua. 12 viikon kohdalla kaikki viisi osteotomiaa olivat histologisesti luutuneet. Sauvojen ympärillä nähtiin ohut sidekudosvyöhyke luun ja implantin välissä. 24 viikon kohdalla neljässä näytteessä todettiin uutta luuta ja aktiivista luuydintä sauvan ympärillä. Mikroradiografisesti nähtiin implanttikanavan olevan vielä kaikissa näytteissä

auki. 36-52 viikon näytteissä todettiin edelleen uudislun muodostusta implantin ympärillä, osassa näytteistä implanttikanavan suuaukko oli peittynyt arpikudoksella. Luinen kallus remodelloitui.

#### Histomorfometria

Trabekulaarisen luun tilavuusosuuden suurin arvo todettiin yhden viikon kohdalla sekä osteotomoiduissa (55,4 %) että kontrollifemureissa (42,4 %).

Osteotomoiduissa femureissa osteoidipinta ja aktiivisen osteoidia muodostavan pinnan osuus saavuttivat korkeimman arvonsa kuuden viikon kohdalla (21 %, 5,2 %). Kuuden viikon jälkeen osteoidipinnan ja aktiivista osteoidia muodostavan pinnan osuudet vähentyivät, pudoten nolnaan 48 viikkoon mennessä. Regressioanalyysillä todettiin että kaikille tutkituille muuttujille voitiin muodostaa malli, joka oli käyräviivaisesti ajasta riippuvainen. Osteotomoituja ja kontrollireisiluita verrattiin parivertailulla (parillinen t-testi). Useimmat T-arvot olivat tilastollisesti merkitseviä 1-36 viikkojen aikana.

OTC-fluoresenssitutkimuksessa osteotomoiduissa reisiluissa voimakkain intensiteetti ja siten voimakkain uudislun muodostus todettiin kuuden ja 12 viikon kohdalla osteotomia-alueella, luukalvolla ja sauvan ympärillä. Intensiteetin kasvu tuli ensimmäiseksi esiin luukalvon alla kolmen viikon kohdalla.

#### Pohdinta

Useita materiaaleja on kokeiltu etsittäessä optimaalista synteettistä biohajoavaa luunkiinnitintä murtumiin. Metallikiinnittimiin liittyy jäykkyystestä johtuva stress-shielding -ilmiö ja luun haurastuminen. Kokeellisesti on todettu polyglykolidi (SR-PGA) soveltumattomaksi painoa kantavan kortikaaliluun kiinnittämiseen [5], mutta hohkaluun kiinnitykseen materiaali on käypä [6-9]. PGA menettää lujuutensa 6-8 viikossa. Hitaammoin hajoava SR-PLLA säilyttää lujuutensa 3-10 kertaa kauemmin kuin SR-PGA. Tässä tutkimuksessa käytetyn SR-PLA70:n lujuusarvot oli-

vat matalammat ja lujuuden säilyminen lyhyempi kuin SR-PLLA- ja SR-PLA96-implanttien vastaavat arvot aiemmissä tutkimuksissa. Amorfisuudesta huolimatta implanttimateriaali on onnistuttu itselujittamaan, jonka ansiosta implantin rakenne on luja [10].

Tässä tutkimuksessa 23/32 (72 %) osteotomioista parantui ongelmitta. Komplisoituneita tapauksia nähtiin melko runsaasti, mikä voi johtua vaativasta leikkaustekniikasta. Makroskooppisia inflammatoireaktioita ei todettu ollenkaan sopien implantin hitaaseen hajoamiseen.

Tutkimuksen lupaavan tuloksen vuoksi kaksi kliinistä tutkimusta SR-PLA70-kiinnittimillä on aloitettu.

#### Kirjallisuusviitteet

1. P. Törmälä, P. Rokkanen, J. Laiho, M. Tamminmäki and S. Vainionpää. US Pat, No 4 743 257, 1988
2. P. Törmälä. Clin Mater 10, 29, 1992
3. Majola, S. Vainionpää, K. Vihtonen, M. Mero, J. Vasenius, P. Törmälä and P. Rokkanen. Clin Orthop 268, 260, 1991
4. R.A. Milch, D.P. Rall, J.E. Tobie, J.M. Albrecht and G. Trivers. J Bone Joint Surg 40A, 897, 1958
5. P. Törmälä, S. Vainionpää, J. Kilpikari and P. Rokkanen. Biomaterials 8, 42, 1987
6. O. Böstman, S. Vainionpää, E. Hirvensalo, A. Mäkelä, K. Vihtonen, P. Törmälä and P. Rokkanen. J Bone Joint Surg Br 69B, 615, 1987
7. O. Böstman, E. Hirvensalo, S. Vainionpää, A. Mäkelä, K. Vihtonen, P. Törmälä and P. Rokkanen. Clin Orthop 238, 195, 1989
8. E. Hirvensalo. Acta Orthop Scand 60, 601, 1989
9. P. Rokkanen, O. Böstman, S. Vainionpää, K. Vihtonen, P. Törmälä, J. Laiho, J. Kilpikari and M. Tamminmäki. Lancet 1, 1422, 1985
10. T. Pohjonen and P. Törmälä, in: 13<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials, p.88, Göteborg, Sweden, 1997