

## KOMPOZITNÍ MATERIÁLY S OTEVŘENOU PÓROVITOSTÍ PRO NÁHRADY KOSTNÍ TKÁNĚ

### POROUS COMPOSITES FOR HARD TISSUE REPLACEMENTS

Miroslav SOCHOR<sup>1</sup>, Karel BALÍK<sup>2</sup>, Tomáš SUCHÝ<sup>1</sup>, Martin ČERNÝ<sup>2</sup>,  
Hana HULEJOVÁ<sup>3</sup>, Vlasta PEŠÁKOVÁ<sup>3</sup>

#### *Abstrakt*

Na kompozitním materiálu připraveném na bázi skelných vláken, který vykazoval shodné mechanické vlastnosti s lidskou kostí, byl studován vliv úpravy povrchu na vrůstání kostní tkáně. Za tímto účelem byly kompozity s různou otevřenou pórovitostí podrobeny testům in vitro a in vivo. Účelem této studie bylo nalézt na základě analýzy mechanických a chemických vlastností, vlastností biotolerance materiál, vhodný pro aplikace ve formě spojovacích, náhradních a výplňových prvků kostí.

**Klíčová slova:** kompozitní materiály, biomateriály, skelná vlákna, polysiloxan, hydroxyapatit, osteointegrace, povrch, kostní dlahy

#### *Abstract*

A composite material was prepared, based on glass fabrics and polysiloxane, which displays mechanical properties similar to those of the human bone, and the effects of surface treatment on osseointegration were studied. The prepared composite samples with controlled open porosity were used to study by methods in vivo and in vitro the effect of the structure of the surfaces thus treated on the downgrowth of bone tissue. The purpose of the study is the application of these materials as connective and substitutive elements in bone surgery on the basis of analysis of mechanical and chemical properties and biotolerance.

**Keywords:** composite materials, biomaterials, glass fibers, polysiloxane, hydroxyapatite, osseointegration, surface, bone plates

## ÚVOD

Kompozitní materiály jako náhrady kostní tkáně jsou předmětem zájmu už více jak čtvrt století [1,2]. Kompozity na bázi uhlíkových, skelných nebo polymerních materiálů, nitridů či karbidů a uhlíkových či různých polymerních matric vykazují, ve srovnání s kovovými materiály běžně užívanými v lékařství, v mnoha případech vhodnější mechanické vlastnosti [4,3]. Předmětem tohoto projektu byla jednoduchá a tedy i relativně levná výroba kompozitních materiálů pro kostní náhrady, výplně a spojovací prvky na bázi komerčně dostupných skelných tkanin a siloxanů s ohybovou pevností a tuhostí srovnatelnou s lidskou kostí, pórovitým povrchem,

<sup>1</sup> doc. Ing. Miroslav SOCHOR, CSc., Ing. Tomáš SUCHÝ, UMBaM, FSJ ČVUT v Praze, [miroslav.sochor@fs.cvut.cz](mailto:miroslav.sochor@fs.cvut.cz), [suchyt@biomed.fsid.cvut.cz](mailto:suchyt@biomed.fsid.cvut.cz)

<sup>2</sup> Ing. Karel BALÍK, CSc., Ing. Martin ČERNÝ, CSc., ÚSMH Akademie věd ČR, Praha, [balik@irms.cas.cz](mailto:balik@irms.cas.cz), [m.cerny@irms.cas.cz](mailto:m.cerny@irms.cas.cz)

<sup>3</sup> Ing. Hana HULEJOVÁ, Mgr. Vlasta PEŠÁKOVÁ, Revmatologický ústav, Praha, [hana.hulejova@seznam.cz](mailto:hana.hulejova@seznam.cz), [pesakova@seznam.cz](mailto:pesakova@seznam.cz)

Lektoroval: prof. Ing. Jozef ŽIVČÁK, CSc., KPaBI, SJF TU v Košiciach, [jozef.zivcak@tuke.sk](mailto:jozef.zivcak@tuke.sk)

který může vykazovat vhodnou stimulaci vrůstu kostních buněk, případně bioaktivitu, nebo je naopak inertní. Jinými slovy příprava materiálu na bázi inertních komponentů s inertním nebo naopak bioaktivním povrchem.

## VÝBĚR MATERIÁLU A POUŽITÉ METODY

Byly připraveny kompozitní materiály na bázi skelných vláken a polysiloxanové matrice. Jako vyztužující složka byly použity skelné tkaniny z E-skla (tkanina V240, VETROTEX, Litomyšl, ČR) a R-skla (saten 21055, VETROTEX, Saint Gobain, Francie). Prekurzorem matrice byly dva druhy polysiloxanové matrice, a to M130 a L901 (Lučební závody, Kolín, ČR). Tímto způsobem byly vyrobeny čtyři druhy kompozitních materiálů, z nichž každý byl kombinací jednoho druhu tkaniny a matrice.

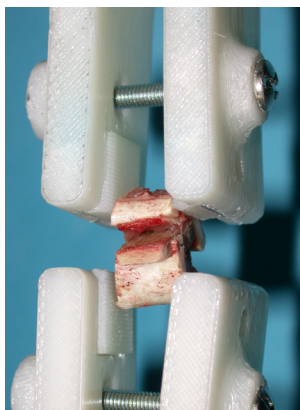
Po stanovení objemových podílů vláken (V<sub>f</sub>) byly ověřeny mechanické vlastnosti. V této fázi byla vyloučena kombinace R-sklo+L901 vzhledem ke značné delaminaci jednotlivých vrstev kompozitu po vytvrzení. Youngův modul (E<sub>res</sub>) a smykový modul (G<sub>res</sub>) byl měřen pomocí elektrodynamické rezonanční metody (Erudite, London, UK), modul pružnosti (E<sub>4p.b.</sub>) a ohybová pevnost (R<sub>m</sub>) byly měřeny čtyř a třibodovým ohybem (Inspekt 100 HT, Hagewald&Peschke, Germany), Youngův modul (E<sub>str.</sub>) a pevnost v tlaku (R<sub>str.</sub>) vzorků ve směru paralelním ke směru osnovy tkaniny byly měřeny pomocí aplikovaných tenzometrů (HBM, Germany) na měřicím systému MTS 858.2 Mini Bionix (MTS Systems Corporation, Minnesota, USA).

Naměřené mechanické charakteristiky posloužily k dalšímu zúžení výběru kompozitů. Byl hledán takový kompozit, který má mechanické vlastnosti podobné vlastnostem lidské kosti. Dalším měřítkem pro výběr kompozitů byly testy biotolerance, při kterých byl použit stabilní kmen fibroblastů LEP, také byla stanovena viabilita osteoblastů a hladiny syntetické aktivity některých cytokinů. V testech byly sledovány biologické vlastnosti – adherence, proliferace a metabolická aktivita buněk rostoucích na testovaných materiálech a hladiny zánětlivých cytokinů exprimovaných během kultivace do buněčného média. Současně bylo provedeno histologické vyhodnocení kostní tkáně s implantáty vloženými do femuru prasete (miniprasata, stáří 3 roky), a to deset týdnů od implantace. Na základě těchto pokusů byly ze čtyř kompozitních typů zvoleny dva materiály, dobře tolerované buňkami a byly tedy vyloučeny kompozitní typy s prekurzorem matrice L901. Pro další výzkum byly tedy dále uvažovány pouze kombinace R-sklo+M130 a E-sklo+M130.

Vzhledem k uvažované aplikaci materiálu byl kompozit dále modifikován. Pro zvýšení stimulace vrůstu kostních buněk byla do nevytvrzeného povrchu vtlačována tělíska speciální soli o kontrolované velikosti a po vytvrzení vymyta. Touto metodou byly vyrobeny vzorky s různou otevřenou pórovitostí, a to v rozmezí 200-400 μm, 400-600 μm a vyšší než 600 μm. Hustota pórů byla v závislosti na jejich rozložení 350-450 pórů na cm<sup>2</sup>. Pro další zlepšení možné osteointegrace byl do matrice některých vzorků přidán práškový hydroxyapatit (HAp) o velikosti částic 5 μm v množství 10 hm.% na matrici. Záměrem bylo ještě více zvýšit stimulaci osteointegrace u vzorků se zjištěnou optimální velikostí pórů. Byla provedena povrchová analýza kompozitů obohacených o HAp infračervenou spektroskopií a rentgen-fluorescenční analýzou. Výsledky IČ analýzy potvrzují přítomnost apatitu na povrchu kompozitu přítomností pásu OH skupin apatitu při 3573 cm<sup>-1</sup>. Přítomnost apatitu potvrzuje i vysoký obsah vápníku (26,7%) a fosforu (4,04%) na povrchu kompozitu.

Dále byla studována rozpustnost kompozitů v modifikovaném esenciálním mediu D-MEM simulujícím tělní prostředí. Expozice 6ks vzorků z obou řad kompozitů bez povrchové úpravy probíhala při teplotě 37°C a pH 7 po dobu 2, 4 a 6 týdnů. V uvedených časových intervalech bylo odebráno medium ke stanovení vyextrahovaného křemíku, současně byly provedeny testy mechanických vlastností na původních a vysušených vzorcích.

Pro posouzení vlivu struktury povrchu na stimulaci vrůstu kostní tkáně byly provedeny in vivo Pull-off testy na pokusných zvířatech – králíci plemena Belgický obr, stáří 1 rok. Tyto testy byly odvozeny od Nakamurovy metody [5.]. Vzorky materiálů o rozměrech (5x10x2)mm byly implantovány pod proximální kondyl femuru. Do kosti byl pomocí diamantového řezného kotouče o tloušťce vzorků nejprve vytvořen otvor odpovídající velikosti vzorku, a to v paralelním směru k podélné ose femuru, asi 10 mm od proximálního kondylu, distálně. Kompozitní vzorek byl do otvoru umístěn tak, aby z kosti minimálně přesahoval ale později nedráždil okolní tkáň. Zvířata byla chována za standardních podmínek podle pravidel platných pro chov laboratorních zvířat v České republice. Vzorky byly z laboratorních zvířat vyjmuty sedm týdnů po implantaci. Z kosti byl pomocí řezného kotouče paralelními řezy oddělen segment obsahující implant tak, že řez byl veden vždy cca 2 mm od okrajů implantu. Segment kosti byl po zafixování v přípravku dále obráběn. Byla odstraněna kostní tkáň mezi konci segmentu a konci kompozitního vzorku. Kostní segment byl na opačné straně od implantačního otvoru proříznut v ose kosti tak, aby spojení obou částí segmentu bylo dáno pouze srůstem kosti a implantu. Takto připravený vzorek byl upevněn do přípravku tak, aby kompozitní vzorek byl v horizontální poloze. K zatěžování byl použit testovací systém MTS 858.2 Mini Bionix (MTS Systems Corporation, Minnesota, USA). Aplikovaná síla pro odtržení působila v kolmém směru na kompozitní vzorek, rychlost posuvu 0,5 mm/min. Byla snímána maximální síla pro prvotní odtržení kompozitního vzorku od kosti. Provedení Pull-off testů je ilustrováno na obr.1.



Obr.1 Vzorek pro Pull-off testy po odtržení v přípravku

## VÝSLEDKY A DISKUZE

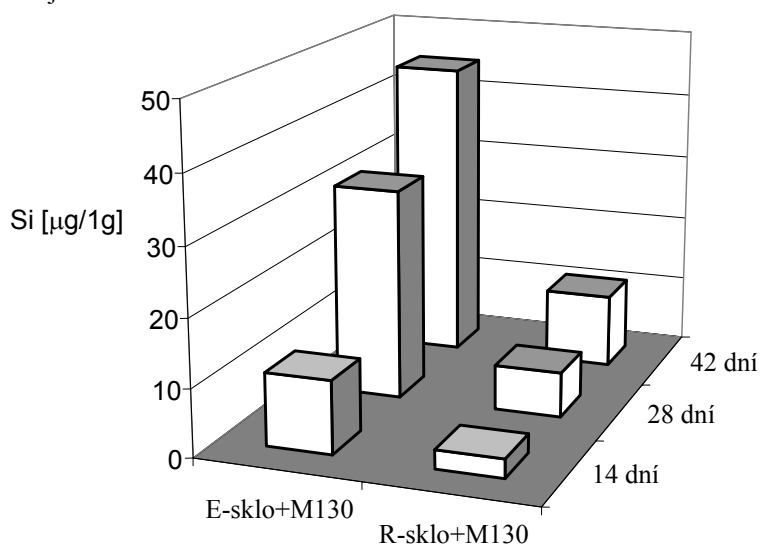
Účelem mechanických zkoušek bylo ověřit chování kompozitu a, vzhledem k uvažované aplikaci, srovnání s vlastnostmi lidské kortikální kosti. Výsledky ukazují (Tab. 1), že skelný kompozit vykazuje vhodné mechanické vlastnosti. Předpokládáme, že jeho vlastnosti umožní, například při použití ve formě vnitřních dlah pro léčbu zlomenin dlouhých kostí, vhodný přenos zatížení a k tomu i částečné zatížení ošetřené kosti, což může s výhodou vést k proliferaci kostní tkáně a její vhodné remodelaci.

Mechanické vlastnosti kompozitů

Tabulka 1

<i>vlastnosti</i>	<b>Vf</b>	<b>Rm</b>	<b>Eres.</b>	<b>E4p.b.</b>	<b>Estr.</b>	<b>Gres.</b>	<b>Rstr.</b>
<i>materiál</i>	[%]	[MPa]	[GPa]	[GPa]	[GPa]	[GPa]	[MPa]
E-sklo+M130	51	200,81	25,38	23,70	32,56	2,39	80,39
E-sklo+L901	52	195,75	27,70	25,70	27,27	2,77	119,90
R-sklo+M130 (osnova)	65*	390,30	53,40	55,94	-	6,69	52,95
R-sklo+M130 (útek)		97,90	16,20	12,22	15,54	5,79	-

Při použití stejné matrice (M 130) pro obě řady vzorků je možno konstatovat, že vyluhování je závislé zejména na druhu skelné výztuže. Dále je nutno též zvážit strukturu obou kompozitů. Zatímco povrch kompozitů na bázi E-skla je především díky plátěné vazbě značně otevřen pro pronikání roztoku, je povrch vzorků na bázi R-skla – saténová vazba tkaniny - více uzavřený. To dokumentuje i rozdílné hodnoty otevřené pórovitosti obou vzorků (E-sklo: 11,4%, R-sklo: 9,7%). Svou roli zde může mít i rozdílný objemový podíl vláken obou kompozitů, viz Tab. 1. S dobou expozice v mediu se v rámci přesnosti měření nemění zdánlivá hustota obou řad zatímco otevřená pórovitost nepatrně klesá. Množství vyextrahovaného křemíku v časových intervalech je uvedeno na obr.2.

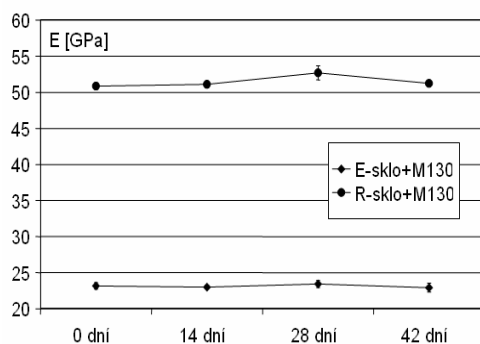


Obr.2 Množství extrahovaného Si v závislosti na době máčení

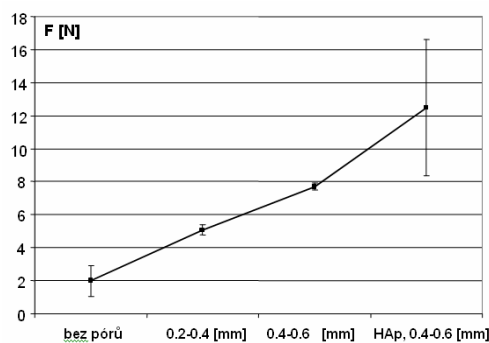
Hodnoty mechanických vlastností, tj. ohybové pevnosti Rm, smykového modulu G i modulu pružnosti E se po vyloužení a vysušení u obou kompozitů prakticky nemění a jsou srovnatelné s výchozími materiály, viz obr.3. Malé odchylky jsou na hranici citlivosti použitých metod měření. Pouze u kompozitu na bázi R-skla lze hovořit o mírném poklesu smykového modulu G.

Z výsledků in vitro a in vivo testů vyplývá, že zvětšení a zdrsnění povrchu materiálů vyrobením množství různě velkých otvorů na jeho povrchu, vede ke stimulaci buněčné viability. Toto zvýšení otevřené pórovitosti má příznivý vliv nejen na proliferaci osteoblastů, ale i na stimulaci produkce protizánětlivého cytokinu IL-10 a na inhibici exprese zánětlivých tkáňových mediátorů. Přitom platí, že otvory o velikosti 200-600 $\mu$ m jsou buňkami lépe akceptovány, než póry větší než 600  $\mu$ m. Obohacení matrice o HAp vede k mírnému zvýšení exprese tkáňových mediátorů, t.j. ke zvýšení syntetické aktivity osteoblastů, ale za současného poklesu buněčné proliferace.

Pull-off testy jsou poměrně jednoduchou a snadno opakovatelnou metodikou pro měření pevnosti spojení na rozhraní implant – kost. Přesto s sebou přináší určité potíže. Operační zákrok je v konečném důsledku poměrně invazivní. U několika pokusných králíků se projevila křehkost kostí – po vyjmutí femuru byly ve směru řezu viditelné praskliny v délce desítek mm. Proto musely být tyto vzorky vyloučeny z vlastního vyhodnocení. Oproti Nakamurovu publikované metodě jsme se snažili snížit tyto sekundární praskliny vytvářením otvoru pro implant pouze na jedné straně kosti, jak je popsáno výše. Při posuzování kvality srůstu pouze pomocí aplikované síly bylo třeba klást důraz na dodržení stejných okrajových podmínek pro všechny implantované vzorky (rozměry, umístění vzorku, stáří pokusných králíků, směr aplikované síly). Z výsledků Pull-off testů vyplývá jasné zvýšení pevnosti srůstu implantovaných vzorků s kostí u materiálů s póry 400-600  $\mu$ m. Další zvýšení je patrné u vzorků s přídavkem HAp, to ilustruje obr.4.



Obr.3 Změna modulu pružnosti v závislosti na době expozice v D-MEM



Obr.4 Závislost síly nutné pro odtržení implantu od kosti na úpravě povrchu implantu a přídavku HAp

## ZÁVĚR

Kompozitní materiály na bázi skelných tkanin a polysiloxanové matrice (především kombinace R-sklo+M130) mají dobré předpoklady k aplikaci v ortopedii. Tyto materiály by mohly být aplikovány ve dvou formách. Jako materiály s optimálními póry o velikosti 400-600  $\mu$ m a s maticí obohacenou přídavkem HAp by mohly být aplikovány ve formě náhrad kostí a výplňových prvků. Jako materiály bez změny struktury povrchu a bez přídavku HAp, které jsou vůči prostředí lidského organismu inertní, by mohly být aplikovatelné ve formě vnitřních dlah pro léčbu konkrétních typů zlomenin dlouhých kostí.

Tato studie byla podpořena projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky pod názvem Transdisciplinární výzkum v oblasti biomedicínského inženýrství II, číslo MSM 6840770012 a Grantovou agenturou ČR (projekt číslo 106/03/1167).

### LITERATURA

- [1] JENKINS, G. M., DE CARVALHO, F. X.: *Biomedical applications of carbon fibre reinforced carbon in implanted prostheses*. Carbon, February 1977, vol. 15, no. 1, p. 33-37, ISSN 0008-6223.
- [2] FITZER, E., HUTTNER, W., CLAES, L., KINZL, K.: *Torsional strength of carbon fibre reinforced composites for the application as internal bone plates*. Carbon, November 1980, vol. 18, no. 6, p. 383-387, ISSN 0008-6223.
- [3] RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E., LEONG, K. W.: *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*. Composites Science and Technology, July 2001, vol. 61, no. 9, p. 1189-1224, ISSN 0266-3538.
- [4] MURUGAN, R., RAMAKRISHNA, S.: *Development of nanocomposites for bone grafting*. Composite Science and Technology, December 2005, vol. 65, no. 15-16, p. 2385-2406, ISSN 0266-3538.
- [5] NAKAMURA, T., YAMAMURO, T., HIAGASHI, S., KOKUBO, T., ITOO, S.: *A new glass-ceramic for bone replacement: Evaluation of its bonding to bone tissue*. Journal of Biomedical Materials Research, 1985, vol. 19, p. 685-698, ISSN: 1549-3296.