

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 pokryw 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 gwoździe PLA/MG również wykazują 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]

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 zbitnej 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 gwoźdź śródszpikowego oraz stosowania długotrwałej antybiotykoterapii. Istotnie wydłuża to czas powrotu pacjenta do 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 rozwiązaniem są 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 polilaktydu) 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 różnorodnymi 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 Hannover, Niemcy [12];

TCP - β -fosforan trójwapienia (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	K9 - PLA/CF/ALG/TCP/GS
K5 - PLA/MG/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 równolegle. 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 powtórnią inokulację (powierzchniową) na powierzchni pożywki tym samym szczepem gronkowca i inkubację trwającą 48 h w temperaturze 37°C, w warunkach tlenowych. Wykonano analizę ilościową i jakościową 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 (γ - 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 % P_2O_5) - 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	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	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 methicillin-sensitive 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):

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

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:

$$A_R = \frac{R_{\max}}{R_{\min}}$$

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 antibakteryjną, 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].

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).

No	Próbka Sample	Ułożenie próbki / Sample position					
		prostopadle / perpendicular			równolegle / horizontal		
		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		
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 stref / no inhibition 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	brak danych / no data			1186 (130)	1.21 (0.08)	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.

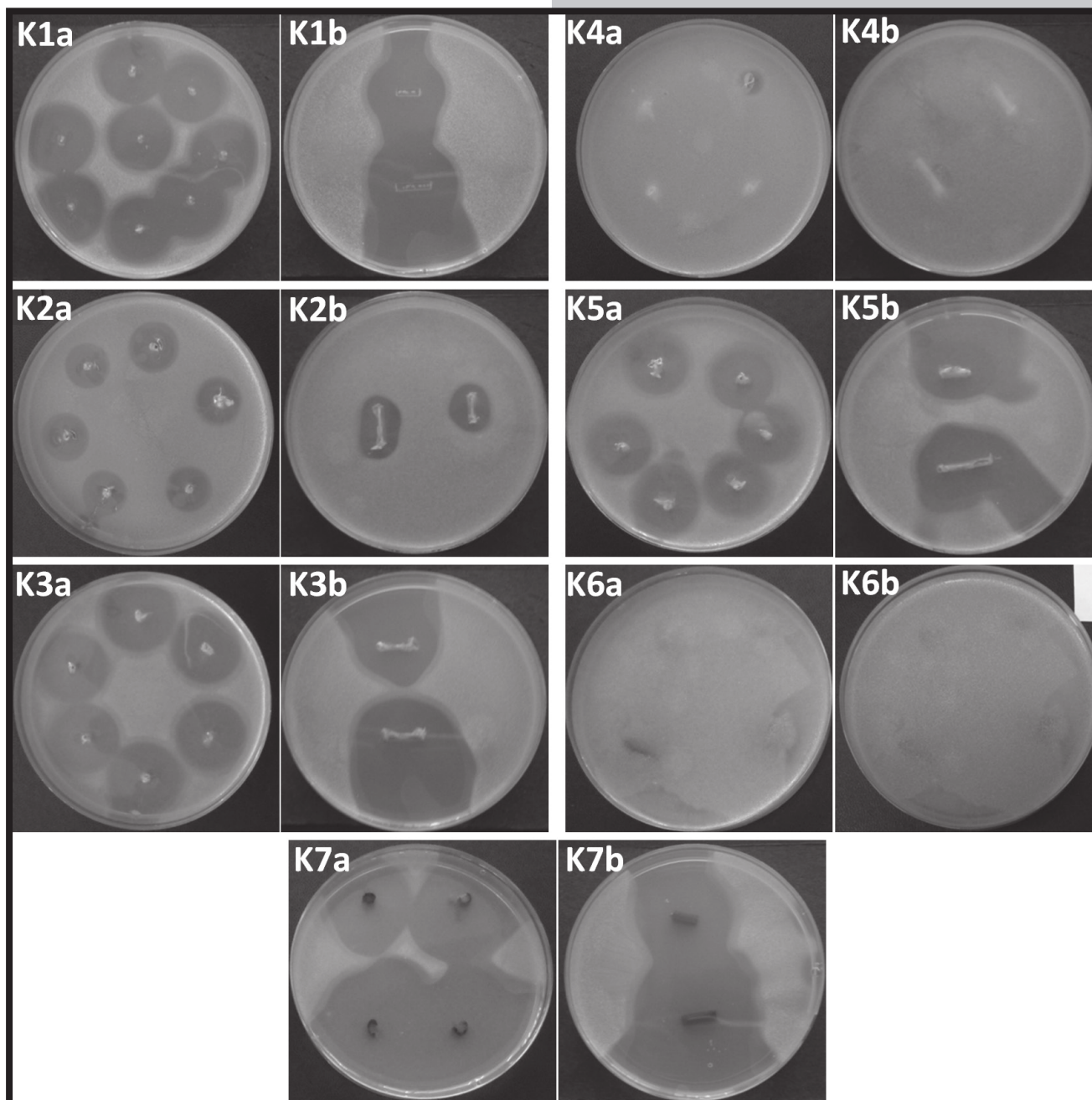
Zarówno w zestawieniu tabelarycznym, jak i na RYS. 1 można zauważyć, że kompozyt oznaczony jako K2 (PLA/MG) pomimo braku antybiotyku w jego składzie także wykazuje właściwości hamujące rozwój bakterii, chociaż o mniejszym stopniu. Również porównując gwoździe K1 (PLA/GS) i K3 (PLA/MG/GS) różniące się jedynie obecnością fazy wzmacniającej w postaci dwóch splecionych drutów ze stopów magnezu, widać wyraźnie większe pole powierzchni stref zahamowania wokół gwoźdźka K3. Związane jest to z aktywnością antibakterijną samych drutów ze stopów magnezu. Robinson *et al.* [14] podaje, że mechanizm działania antybakteryjnego 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].

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].

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 A_R 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 prostopadłe (a) i równoległe (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 $197 \pm 18 \text{ mm}^2$ dla próbek PLA/MG (K2) oraz $11,8 \pm 0,8 \text{ mm}^2$ dla próbek PLA/MG/TCP (K4). Podobny wpływ TCP obserwuje się dla gwoździ zawierających siarczan gentaminy (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 $197 \pm 18 \text{ mm}^2$ and $11.8 \pm 0.8 \text{ mm}^2$ 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 uwagę ich nieregularność w przypadku gwoździ ułożonych równolegle do powierzchni szalki. Również porównanie parametrów geometrycznych (TABELA 1) 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 prostopadle: 1,03-1,28; równolegle: 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 zabezpieczeniu 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 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 gwoździe 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.

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.

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.

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 Sample	Pole powierzchni Surface area [mm ²]	
		po 48 h after 48 h	po 12 dniach 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)

Wnioski

Opracowane materiały kompozytowe modyfikowane siarczanem gentaminy 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.

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.

Pismienictwo

- [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 vivo-in 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.

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.