Badania bioaktywności modyfikowanego cementu kostnego – przegląd literaturowy

The bioactivity of modified bone cement – literature review

Marcin Wekwejt, Beata Świeczko-Żurek

Politechnika Gdańska, Katedra Inżynierii Materiałowej iSpajania,Wydział Mechaniczny,
ul. 11/12 Narutowicza, 80-233 Gdańsk, Poland, tel. +48 ....., e-mail: marcin.wekwejt@wp.pl

Wprowadzenie

Cement kostny to specyficzny biomateriał, występujący w postaci samopolimeryzującej i twardniejącej masy. Znajduje on szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach medycyny, w szczególności: w chirurgii ortopedycznej, traumatologii oraz chirurgii szczękowo-twarzowej. Powstaje w efekcie reakcji polimeryzacji rodnikowej poprzez zmieszanie ze sobą dwóch składników (Rys. 1) – proszku (polimeru) z płynem (monomerem). Ma strukturę wzajemnie poplątanych łańcuchów polimerowych. Wyróżnia się następujące cementy kostne: polimerowe, fosforanowo-wapniowe, hydrożelowe, kompozytowe oraz bioaktywne akrylanowe [1-4].

Cement kostny stosowany jest m.in. do [2, 4]:

- wypełniania ubytków kostnych,
- mocowania i spajania implantów (głównie endoprotez),
- stabilizacji skomplikowanych złamań.

???

Streszczenie

Celem pracy jest przybliżenie aspektów związanych z modyfikowaniem cementu kostnego w celu nadania mu właściwości bioaktywnych. Przedstawiono obecnie stosowane bioaktywne modyfikacje, które mają charakter profilaktyczny (zapobiegają infekcjom), terapeutyczny (zwalczają bakterie) oraz pobudzający osteointegrację. Ukazano metody oceny modyfikacji bioaktywnych i zreferowano ich procedury, m.in. badania mikroskopowe, starzenie w roztworze Ringera, określanie dawki uwalnianej modyfikacji, pomiar strefy zahamowania wzrostu bakteryjnego, badania cytotoksyczności, przylegania i proliferacji komórek żywych, badanie pirogenności, test hemolityczny oraz badania kliniczne.

Słowa kluczowe: cement kostny, bioaktywność, antybakteryjność, cytotoksyczność

Abstract

The aim of the literature review is to present the aspects related to modification of bone cement to give it bioactive properties. It presents currently used bioactive modifications, which have preventive activity (reduce the risk of infection), therapeutic activity (fight against bacteria) and stimulating osteointegration. Shows methods for evaluating bioactive modifications and discusses procedures, i.a.: microscopic studies, aging in Ringer's solution, determination of release dose, measurement of bacterial growth inhibition zone, cytotoxicity test, adhesion and proliferation of live cells survey, pyrogenicity test, haemolytic assay, and clinical studies.

Key words: bone cement, bioactivity, antibacterial, cytotoxicity

otrzymano / received:
??.??.2017
poprawiono / corrected:
??.??.2017
zaakceptowano / accepted:
??.??.2017

Rys. 1 *Składniki i struktura cementu kostnego*
Źródło: [5, 6].

Bioaktywność cementu kostnego

Obecnie stosowane cementy kostne oprócz podstawowych właściwości mechanicznych oraz biozgodności (tj. braku toksyczności, braku wywoływania reakcji układu odpornościowego, niewywoływania hemolizy) dodatkowo powinny się cechować właściwościami bioaktywnymi. Bioaktywny cement kostny to taki, który posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz pobudza osteointegrację. Bioaktywne cechy mają zapewnić większe powodzenie jego zastosowania, gdyż z każdą operacją związane jest ryzyko zanieczyszczenia bakteryjnego, natomiast szybsze związanie z tkanką kostną umożliwia trwałą biointegrację. Modyfikacje bioaktywne cementu kostnego z jednej strony umożliwiają profilaktykę zakażeń, z drugiej natomiast mogą mieć zastosowanie w terapii zaistniałych zakażeń. Na potencjalną infekcję wpływają różne czynniki, m.in.: właściwości fizycznochemicznych powierzchni cementu kostnego, struktura powierzchni komórkowej oraz receptory bakterii. Z przeprowadzonych statystyk zaobserwowano, że za ok. 50% wszystkich zakażeń pooperacyjnych odpowiada bakteria *Staphylococcus aureus* (tj. gronkowiec złocisty), następnie dość popularne szczepy to m.in.: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* czy *Acinetobacter baumanni*. W wyniku przeprowadzenia analiz stwierdzono, że bioaktywny cement kostny powinien przede wszystkim posiadać właściwości bakteriobójcze [7-10].

Najpopularniejszym stosowanym obecnie rozwiązaniem w celu nadania cementowi kostnemu właściwości bakteriobójczych jest dodawanie do jego składu antybiotyku. Uwalniane jego cząsteczki niszczą jednostki bakteryjne, które mogły potencjalnie zostać wprowadzone w miejscu zabiegu, co doprowadziłoby do ich namnażania i rozwoju infekcji. Zakażenie bakteryjne w efekcie skutkuje niepowodzeniem zabiegu implantacyjnego oraz wymaga reoperacji [11-13]. Do przykładowych stosowanych antybiotyków należą m.in.: gentamicin, cephazolin, tobramycin, minocycline, clindamycine, ciprofloxacin [13, 14]. Na uwalnianie cząstek antybiotyku z porów cementu kostnego wpływa m.in.: rodzaj cementu, jego porowatość, lepkość, sposób mieszania z antybiotykiem, rodzaj oraz stężenie antybiotyku lub ich kombinacji. Niestety w przypadku modyfikacji antybiotykami pojawiają się problemy – tj. np. zbyt krótki okres terapeutyczny (w wyniku wypłukiwania cząstek antybiotyku lub zbyt szybkiego ich uwalniania) oraz ciągły wzrost antybiotykoodporności bakterii [12-14]. Stąd obecnie poszukuje się innych modyfikatorów, do których należą m.in.: jony srebra, nanocząstki srebra, xylitol czy nanocząstki chitosanu [15, 16].

W przypadku stosowanych dodatków w celu pobudzania tworzenia biowiązań przez tkankę kostną eksperymentalnie modyfikowano cement kostny m.in.: ceravitalem, hydroksyapatytem oraz bioszkłem. Przeprowadzone badania *in vitro* sugerują, że modyfikacje te sprzyjają kolonizacji komórek macierzystych na powierzchni cementu kostnego oraz ich proliferacji i różnicowaniu. W efekcie przyspiesza się proces osteointegracji i uzyskuje się pełną biointegrację implantu z otaczającą tkanką [10, 16, 17].

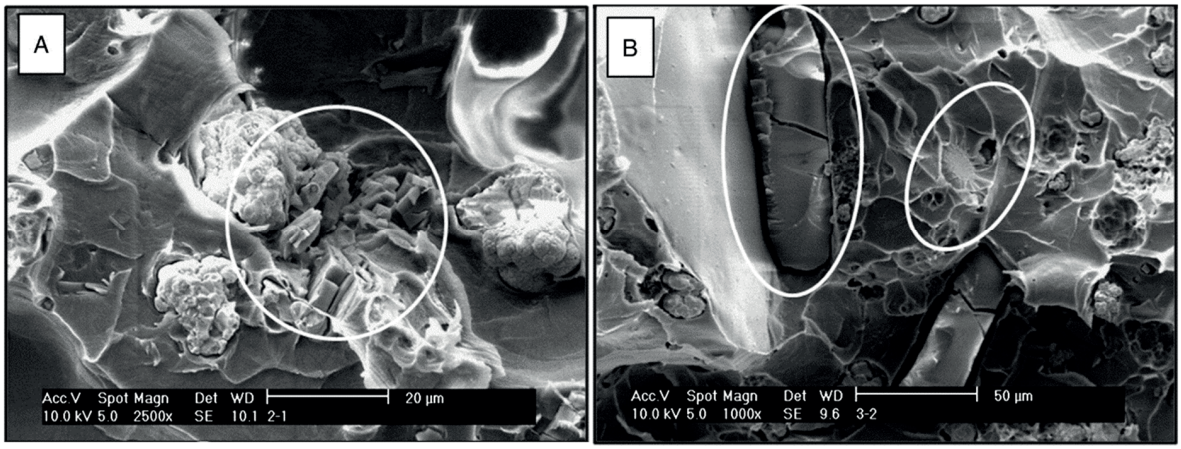
Metody badań bioaktywności cementu kostnego

Badanie struktury [12]

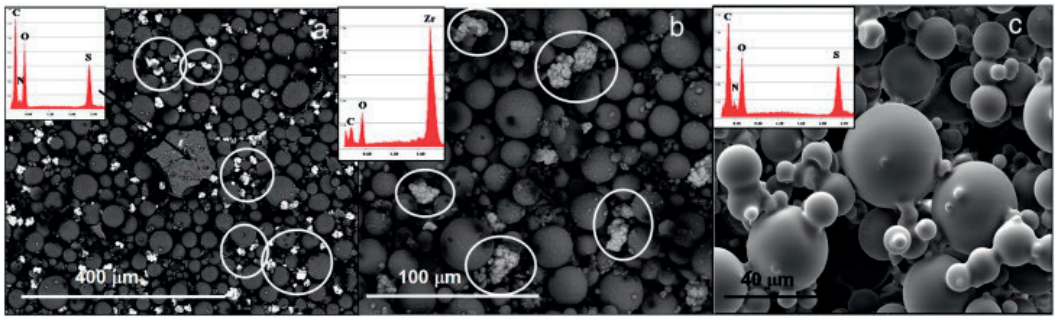
Pierwszym podstawowym badaniem cementu kostnego jest ocena jego struktury. W tym celu przeprowadza się analizę mikroskopową przy wykorzystaniu odpowiedniej aparatury, np. mikroskopu SEM (*Scanning Electron Microscope*) z analizą EDS (*Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*). Analizie należy poddać skład chemiczny, porowatość cementu kostnego, rozmieszczenie cząstek modyfikacji i ogólną jego jakość. Przykładowe efekty analizy przedstawiono na rysunku 2.

Analizie można poddać także proszek cementu kostnego z dodanymi cząstkami antybiotyku. Może mieć to na celu ogólną ocenę komercyjnie zakupionego cementu kostnego. Uzyskane wyniki umożliwiają analizę kształtu i rozmiaru proszku oraz cząstek antybiotyku bądź jakości dodatków (np. środków kontrastujących, w tym przypadku cząstek ZrO_2) (Rys. 3).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 2 *Badanie SEM struktury cementu kostnego z antybiotykiem (A-cefazolin, B-vankomycyna) [w kółkach kryształy/cząstki antybiotyku]*
Źródło: [13].



Rys. 3 *Zdjęcie SEM z analizą EDS proszku cementu kostnego (a i b) oraz proszku z dodatkiem gentamycyny (c) [agregacji ZrO_2 zaznaczone białymi kółkami]*
Źródło: [12].

Badanie wpływu agresywnego środowiska [14, 18]

Kolejnym istotnym badaniem jest sprawdzenie wpływu agresywnego środowiska na zmodyfikowany cement kostny. Środowisko uzyskuje się w postaci specjalnego roztworu SBF, który symuluje agresywny charakter środowiska organizmu człowieka. Badanie polega na zanurzeniu w nim próbek cementu kostnego w warunkach temperatury 37°C, następnie wyjęciu próbek po 7, 14 i 28 dniach, delikatnym przemyciu wodą destylowaną i poddaniu analizie mikroskopowej, np. SEM. Zgodnie z literaturą podstawowy roztwór SBF ma następujący skład: Na^+142.0, K^+ 5.0, Mg^{2+}1.5, Ca^{2+} 2.5, Cl^- 147.8, HCO_3 4.2, HPO_4^{2-} 1.0, SO_4^{2-} 0.5 mol/m^{-3}. Analizie poddaje się powierzchnie cementu kostnego, a w szczególności jej zmiany oraz wpływ na cząstki modyfikujące (Rys. 4 i 5).

Badanie uwalniania antybiotyku [18-20]

Badanie polega na zanurzeniu próbek cementu kostnego z dodatkiem antybiotyku w określonej objętości roztworu SBF (*Simulated Body Fluid*) na 28 dni w temperaturze 37°C. Należy cyklicznie pobierać określoną ilość płynu – np. 2 ml oraz analizować stężenie antybiotyku przy użyciu np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Objętość roztworu jest wyliczana na podstawie próbki z następującego wzoru:

$$V(ml) = S(mm^2)/10 \qquad [19].$$

W przypadku sprawdzania uwalniania leku *in vitro* posłużono się śrutem cementu kostnego umieszczonego w roztworze 5 ml roztworu SBF, który zamknięto w worku dializacyjnym (MWCO = 3500), a następnie zanurzono w 30 ml roztworu PBS w temperaturze 37°C. Uwalnianie leku kontrolowano za pomocą spektrofotometru UV-vis.

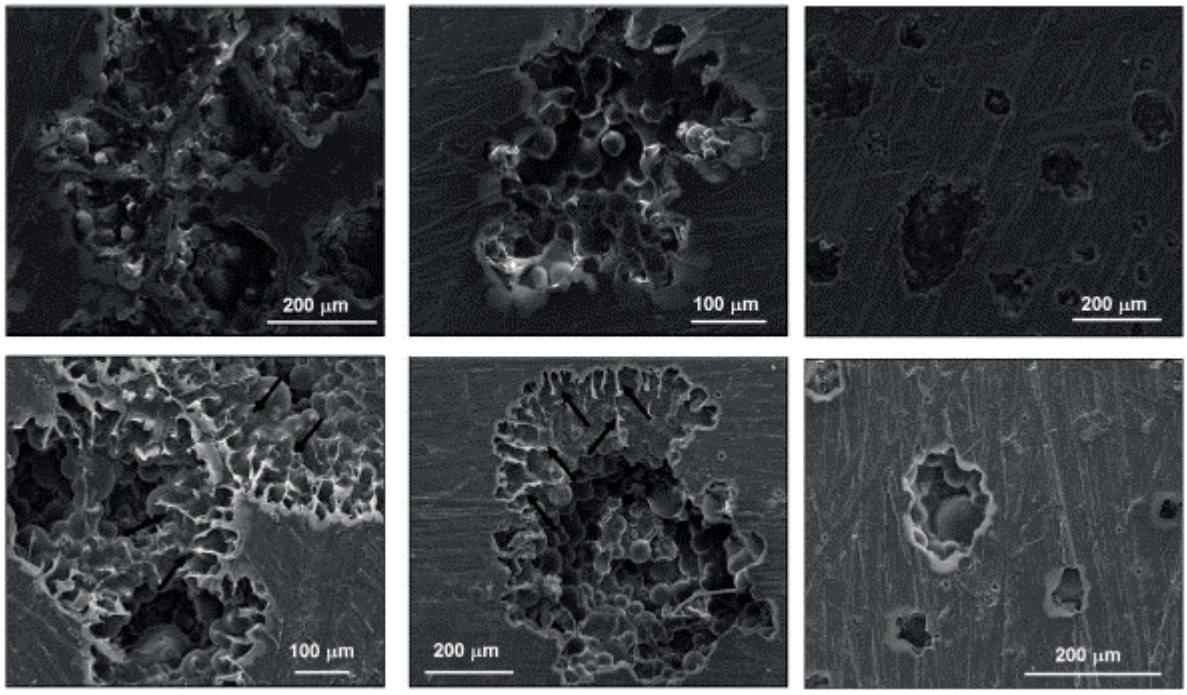
Badanie uwalniania modyfikacji [20]

Podobnie jak w przypadku badania uwalniania antybiotyku można sprawdzić uwalnianie innych dodatków, np. nanocząstek srebra. Próbki zmodyfikowanego cementu kostnego pozostają zanurzone w 10 ml roztworu SBF przez 7 dni. Należy codziennie zmienić roztwór, aby ocenić dzienną dawkę uwalniania jonów srebra. Do analizy stosuje się np. spektometrię mas sprzężoną z plazmą wzbudzaną indukcyjnie.

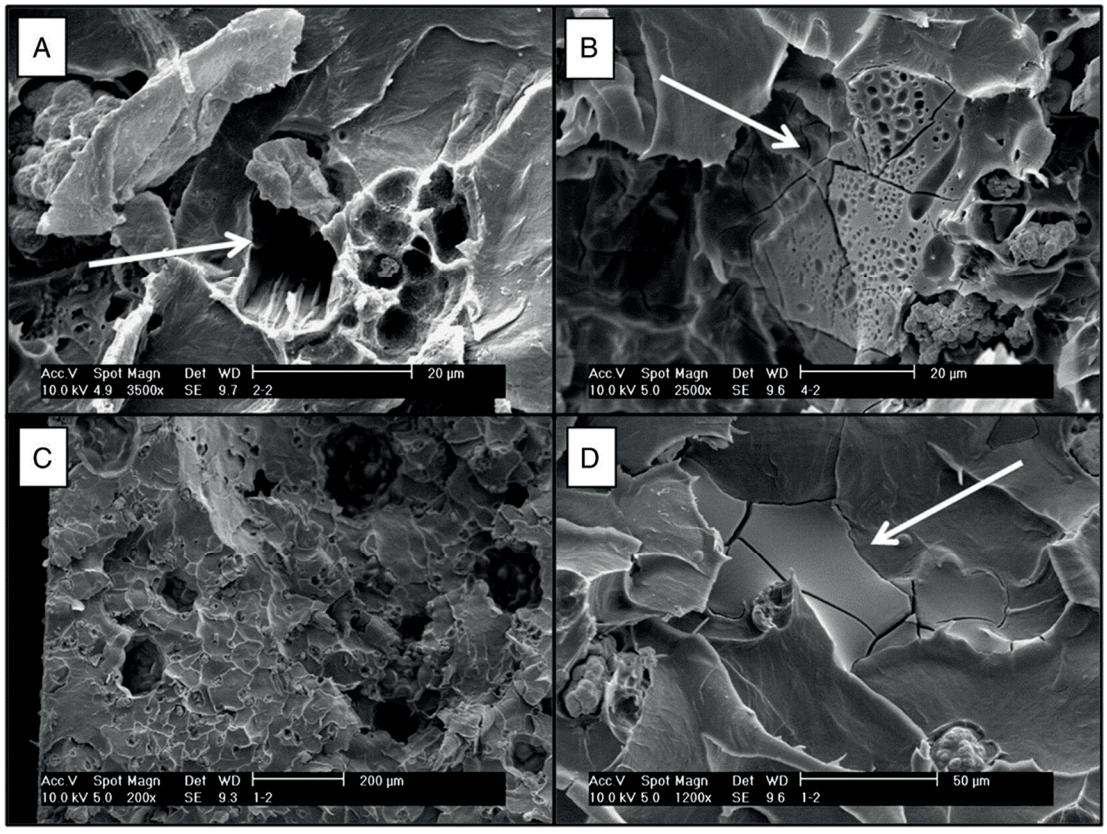
Test doboru dawki antybiotyku – metodą mikrorozcieńczeń w bulionie [12, 19]

Test ma na celu dobranie odpowiedniej dawki antybiotyku, która zapewnia odpowiednią bioaktywność. Opisany w literaturze

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 4 *Porównanie próbki cementu kostnego przed i po starzeniu w roztworze SBF*
Źródło: [12].



Rys. 5 *Wpływ starzenia na strukturę cementu kostnego (strzałki pokazują pęknięcia, mikropęknięcia i pustki)*
Źródło: [12].

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

bulion ma następujący skład: *S.aureus* (ATCC 25923), *S.aureus* (CIP106760), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228). Wszystkie roztwory zostały rozcieńczone w stężeniu od 0,03 do 2 mg/mL w pożywce agarowej Müeller-Hinton. Bakterie inkubuje się w odpowiednich dla nich warunkach przez 24 godziny. Następnie do kolejnych próbek bulionu bakteryjnego wkrapla się antybiotyk o różnych koncentracjach. Rozwój bakterii jest oceniany na podstawie pomiaru absorbancji przez automatyczny czytnik.

Badanie strefy zahamowania wzrostu bakterii [16, 21, 22]

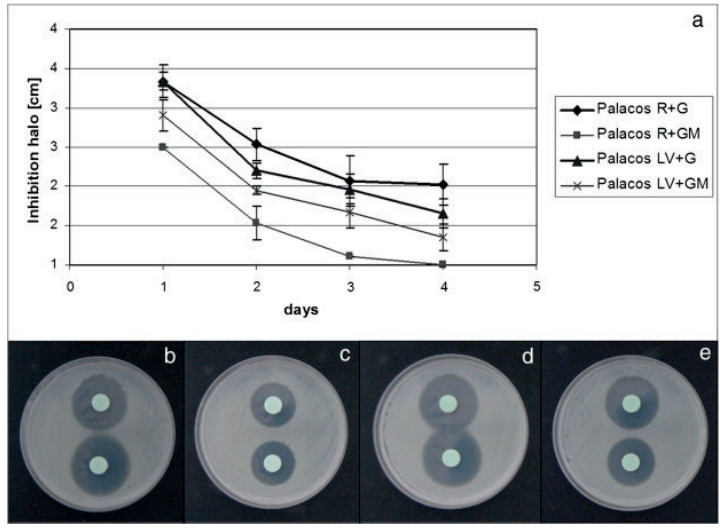
Jest to podstawowe badanie bioaktywności cementu kostnego. Przeprowadza się je poprzez umieszczenie próbki modyfikowanego cementu kostnego w pożywce z bakteriami (np. *Staphylococcus aureus*) po 24h ich inkubacji o początkowym stężeniu bakterii ok. 1-2x10^8 CFU/ml. Następnie obserwuje się i mierzy strefę zahamowania wzrostu bakterii. Badanie to opiera się na normach NCCLS dotyczących wrażliwości na środki przeciwdrobnoustrojowe. Przykładowe wyniki badań przedstawiono na rysunku 6.

Badanie cytotoksyczności [8, 10]

Badania cytotoksyczności mają na celu określenie wpływu modyfikacji na organizm człowieka, a w szczególności wykluczenie jej toksyczności. Do badań tych można wykorzystać komórki zwierzęce, np. komórki fibroblastów (3T3) lub komórki osteoblastów (TMOb) myszy lub ludzkie, np. mezenchymalne komórki macierzyste (hMSCs), komórki osteoblastów MG-63 lub Saos-2 czy komórki mięśniaka kostnopochodnego. Przykładowe warunki hodowli: komórki namnażane w pożywce hodowlanej α-MEM uzupełnionej 10% płodową surowicą bydlęcą oraz 1% penicyliny (100 U ml^{-1}) oraz siarczanem stryptomycyny (100 mg ml^{-1}). Komórki były hodowane w warunkach nawilżonej atmosfery 95% powietrza z 5% dwutlenku węglu i temperaturze 37°C. Pożywka była wymieniana co 2 dni. Urywki komórek zostały oddzielone przy użyciu 0,25% trypsyny i dodane do świeżych pożywek hodowlanych o różnych gęstościach. Podstawowa forma badania ma na celu sprawdzenie żywotności komórek w obecności modyfikowanego cementu kostnego.

Badanie przylegania i proliferacji komórek [8, 10, 23]

Zawiesina komórkowa o gęstości komórek 2 x 10^4 w dawce 1 ml została ulokowana na specjalnej płytce do hodowli komórkowej. Następnie położono na niej próbki cementu kostnego. Płytki były przetrzymywane w atmosferze 95% powietrza oraz 5% dwutlenku węgla i temperaturze 37°C. Po sześciu godzinach

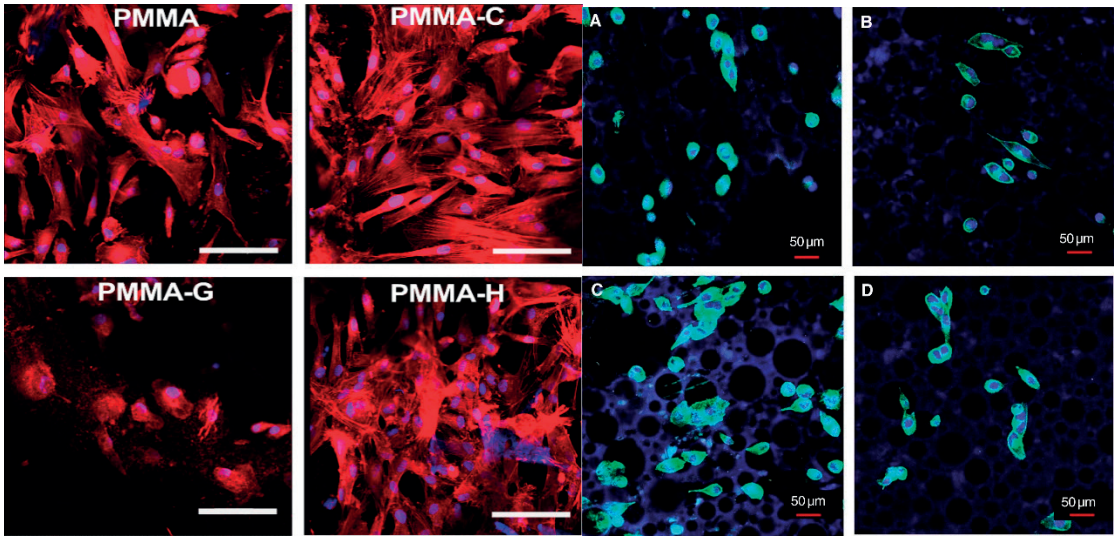


Rys. 6 *Przykładowe wyniki badania strefy zahamowania wzrostu bakterii Źródło: [12].*

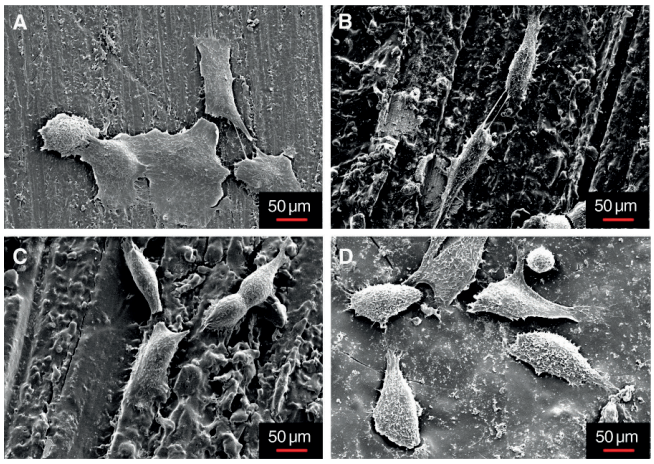
dodano 1 ml roztworu MTT (tj. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), następnie inkubowano przez cztery godziny. Po tym czasie wylano roztwór. W celu rozpuszczenia soli formazanu dodano 1 ml roztworu DMSO (dimetylosulfoksydu). Do kontroli zastosowano automatyczny czytnik do badania wartości absorbancji. Dodatkowo komórki były sprawdzane przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego.

Proliferację komórek oceniano w zawiesinie komórkowej o gęstości komórek 5 x 10^3 w dawce 1 ml, ulokowanej na specjalnej płytce do hodowli komórkowej, przetrzymywanej w warunkach wilgotnej atmosfery (95% powietrza i 5% dwutlenku węgla) i temperaturze 37°C. Na płytce położono próbki cementu kostnego. Do oceny użyto roztworu MTT, który był podawany po jednym dniu, następnie po czterech i siedmiu dniach w dawce 0,1 ml. Roztwór inkubowano do czasu uzyskania formy formazanu, który następnie rozpuszczano roztworem DMSO. Do badania zastosowano automatyczny czytnik do badania gęstości optycznej. W celu oceny wytwarzania nitkowych wiązań aktynowych cytoszkieletu komórek zastosowano skanujący laserowy mikroskop konfokalny (Rys. 7). Po okresie inkubacji próbki cementu kostnego przemywano roztworem soli fizjologicznej i przetrzymywano przez 15 minut w 3,7% formaldehydzie. Następnie w celu permeabilityzacji dodano 0,1% roztwór soli fizjologicznej z sufaktantem – Triton X-100 i odczekano kolejne 15 minut. Po trzykrotnym przemyciu solą fizjologiczną dodano barwnik – Alexa Fluor 555 phalloidin na jedną godzinę. Po tym czasie kolejny raz przemyto próbki, które dodatkowo zabarwiono przy wykorzystaniu roztworu DAPI (tj. 4',6'-diamidino-2-phenylindole) w celu ujawnienia jąder komórkowych (Rys. 7). Po tych procedurach obserwowano komórki przy użyciu mikroskopów (Rys. 7 i 8).

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 7 *Przykładowe zdjęcia z laserowego mikroskopu konfokalnego próbek cementu kostnego z ukazaniem morfologii cytoszkieletu komórek dla różnych rodzajów cementu kostnego*
Źródło: [10, 17].



Rys. 8 *Przykładowe zdjęcia ze elektronowego mikroskopu skaningowego próbek cementu kostnego po badaniach cytotoksyczności (7. dzień)*
Źródło: [17].

Badanie pirogenności [20]

Badania pirogenności mają na celu sprawdzenie, czy zastosowana modyfikacja ma działanie pirogenne, czyli wywołujące gorączkę. Przeprowadza się je na organizmach żywych, np. królikach. Wybrane do badań osobniki powinny charakteryzować się zbliżoną wagą (np. 2-2,5 kg) oraz stosunkowo stałą temperaturą w zakresie 38-39,6°C. W celu zakwalifikowania odpowiednich okazów należy kontrolować ciepłotę ciała przez 4 godziny co 30 minut. W celu przygotowania ekstraktu należy zmieszać śrut modyfikowany cementu kostnego wraz z roztworem 0,9% soli fizjologicznej, który przed podaniem jest inkubowany w temperaturze 38°C przez 24 godziny. Test polega na powolnym wstrzyknięciu substancji do żyły przyusznej królika w ciągu 15 minut. Następnie należy zmierzyć temperaturę ciała osobnika, np. sześciokrotnie co 30 minut.

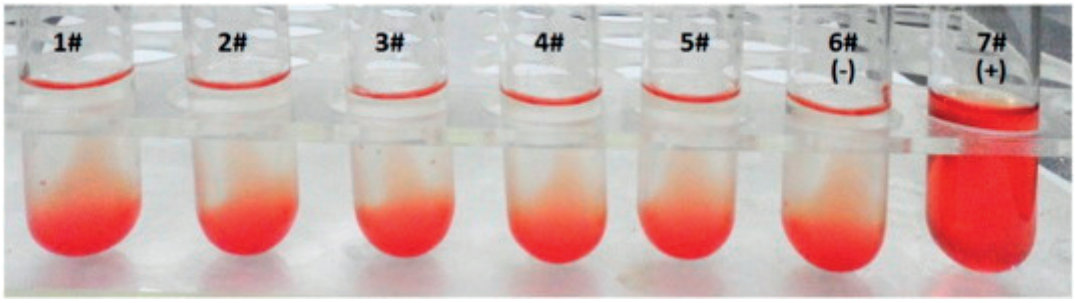
Test hemolityczny [20]

Test ma na celu sprawdzenie, czy modyfikowany cement kostny wywołuje hemolizę czerwonych krwinek. Aby przeprowadzić test hemolityczny, należy pobrać świeżą krew ze zwierzęcia, np. z królika, a następnie wyizolować czerwone krwinki w procesie wirowania. Uzyskane czerwone krwinki trzeba trzykrotnie przemyć i przygotować 2% zawiesinę w roztworze soli fizjologicznej. Śrut modyfikowanego cementu należy dodać do roztworu soli fizjologicznej i inkubować w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Kolejny etap to połączenie tych dwóch mieszanin w fiolce. Jako próbę kontrolną miesza się zawiesinę czerwonych krwinek z wodą dejonizowaną. Badane próbki są przechowywane w temperaturze 38°C i sprawdzane pod kątem wystąpienia hemolizy w okresach: pół godziny, godziny, dwóch godzin oraz trzech godzin. Przykładowe wyniki tego testu przedstawiono na rysunku 9.

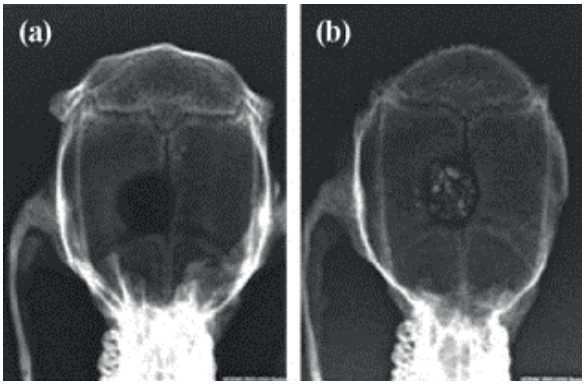
Badania kliniczne [25]

Po przeprowadzeniu podstawowych badań mechanicznych i biologicznych następnym etapem są badania kliniczne. Mają one na celu dokładną ocenę wpływu zmodyfikowanego cementu kostnego na organizm żywy. Procedura przykładowego badania *in vivo* przeprowadzonego na szczurze jest następująca: zwierzę zostaje uśpione, następnie należy wygolić mu czaszkę i po wyjałowieniu jodyną nacina się skórę wzdłuż szwu strzałkowego. Należy przeciąć warstwę skórną, tkankę łączną i okostną, aby umożliwić dostęp do kości ciemieniowej czaszki. W kości nawierca się otwór wylotowy o grubości 5 mm w równej odległości od szwu strzałkowego przy użyciu wolonoobrotowego wiertła dentystycznego przy stałym przepłukiwaniu roztworem soli fizjologicznej. Powstałe defekty zasklepia się modyfikowanym cementem kostnym, a tkanki zostają zaszyte. Zwierzę zostaje pod obserwacją przez sześć tygodni, po czym jest usypiane.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl



Rys. 9 *Przykładowe wyniki testu hemolitycznego (1-5 próbki badane, 6 i 7 próbki kontrolne)*
Źródło: [20].



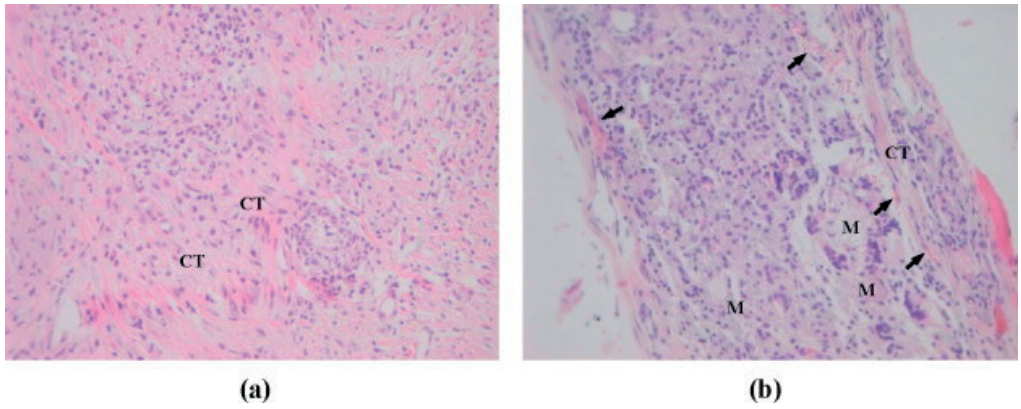
Rys. 10 *Przykładowe zdjęcia RTG czaszki szczura (a – próba kontrolna, b – z modyfikowanym cementem kostnym)*
Źródło: [25].

W tym okresie przeprowadza się kontrolę przy wykorzystaniu radiografii. Przykładowe zdjęcia RTG przedstawiono na rysunku 10. W celu pobrania próbek należy rozciąć skórę i wyciąć je wraz z otaczająca kością. Z pobranych kości przygotowuje się preparaty do analizy histologicznej. W celu obrazowania struktur wykorzystuje się barwniki, np.: hematoksylinę i eozynę. Przykładowe histologiczne mikrofotografie pokazano na rysunku 11.

Inne przykładowe badanie *in vivo*, które zostało przeprowadzone na królikach, przebiega następująco: wywiercono otwór w krętarzu większym kości udowej, przeczyszczono i poszerzono kanał udowy. Wstrzyknięto 100 µl zawiesiny bakteryjnej (tj. *Stapylococcus aureus*) i 1,2 grama zmodyfikowanego cementu kostnego. W badaniu tym sprawdzano skuteczność dwóch bioaktywnych modyfikacji cementu kostnego, tj. antybiotyku i srebra. Zastosowano dodatkowo, jako próbę kontrolną, czysty niemodyfikowany cement kostny. Zwierzęta po zabiegu były kontrolowane przez dwa tygodnie (określano ich dzienną aktywność, temperaturę oraz przeprowadzano testy krwi – poziom OB i poziom białych krwinek). Po tym czasie zwierzęta uśpiono, pobrano ich kości wraz z otaczającą tkanką i przygotowano próbki do badań histopatologicznych. Przeprowadzone badanie pokazało, jak ważna jest kompleksowość badań. Okazało się bowiem, że modyfikacja, która była efektywna w badaniach biologicznych w aspekcie bakteriobójczym (tzn. jony srebra), jest nieskuteczna w przypadku aplikacji do organizmu żywego, gdyż wystąpiła infekcja [26].

Podsumowanie

Obecnie stosowane biomateriały aplikowane do organizmu człowieka, oprócz podstawowych wymagań, powinny spełniać dodatkowe oczekiwania. Niezbędne są optymalne właściwości mechaniczne, pełna biozgodność, odporność na agresywne środowisko człowieka. Dodatkowo oczekuje się właściwości bioaktywnych (m.in. profilaktyczne w przypadku infekcji czy pobudzające osteointegrację), długoterminowej stałości właściwości oraz niskiego kosztu.



Rys. 11 *Przykładowe mikrofotografie histologiczne (a – pobrana kość, b – obszar implantacji cementu kostnego) [czarne strzałki – nowa kość, CT- tkanka łączna, M – cement kostny]*
Źródło: [25].

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

W przypadku cementu kostnego popularną modyfikacją w celu nadania mu właściwości bioaktywnych jest dodatek antybiotyku. Metoda ta, choć obecnie stosowana komercyjnie, nie jest idealna i wiążą się z nią problemy: rosnąca antybiotykooporność bakterii, niszczenie cząstek antybiotyku w procesach polimeryzacyjnych cementu kostnego lub zbyt krótki okres terapeutyczny (jako efekt wypłukiwania czy zbyt szybkiego uwalniania cząstek z porów cementu). Dlatego poszukuje się innych modyfikacji cementu kostnego i prowadzone są liczne badania.

Do badań pośrednio lub bezpośrednio sprawdzających bioaktywność zmodyfikowanego cementu kostnego zalicza się:

- badania mikroskopowe w celu oceny rozkładu cząstek modyfikacji,
- badanie wpływu agresywnego środowiska na cząstki modyfikacji,
- badanie uwalniania cząstek modyfikacji,
- badanie strefy zahamowania wzrostu bakterii,
- badanie cytotoksyczności,
- badania przylegania i proliferacji komórek żywych,
- badanie pirogenności,
- test hemolityczny,
- badania kliniczne.

Należy zwrócić uwagę, że tylko kompleksowo przetestowany zmodyfikowany cement kostny można uznać za skuteczny i rozważać jego zastosowanie w medycynie. Oprócz badań opisanych w pracy konieczne jest także przeprowadzenie podstawowych badań właściwości mechanicznych. Ma to na celu sprawdzenie, czy modyfikacja, która dodaje cementowi kostnemu właściwości bioaktywne, nie zaburza jego właściwości mechanicznych, co będzie prowadzić do braku jego funkcyjności.

Literatura

1. I. Koh, Y. Gombert, C. Persson, H. Engqvist, B. Helgason, S.J. Ferguson: *Ceramic cement as a potential stand-alone treatment for bone fractures: An in vitro study of ceramic–bone composites*, J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 61, 2016, 519-529.
2. A. Balin*: Cementy w chirurgii kostnej*, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 2016.
3. I. Koh, A. López, A.B. Pinar, B. Helgason, S.J. Ferguson: *The effect of water on the mechanical properties of soluble and insoluble ceramic cements*, J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 51, 2015, 50-60.
4. J. Slane, J. Vivanco, J. Meyer, H.-L. Ploeg, M. Squire: *Modification of acrylic bone cement with mesoporous silica nanoparticles: Effects on mechanical, fatigue and absorption properties*, J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 29, 2014, 451-461.
5. www.dotmed.com
6. www.teknimed.com/products-portfolio/products/orthopaedic-trauma-cmf/arthroplasty-cranioplasty-bone-cements/gentafix-3
7. G. Massazza, A. Bistolfi, E. Verné, M. Miola, L. Ravera, F. Rosso: *Antibiotics and cements for the prevention of biofilm-associated infections*, Woodhead Publishing Limited, 2014.
8. A.C. Matos, L.M. Gonçalves, P. Rijo, M.A. Vaz, A.J. Almeida, A.F. Bettencourt: *A novel modified acrylic bone cement matrix. A step forward on antibiotic delivery against multiresistant bacteria responsible for prosthetic joint infections,* Mater. Sci. Eng. C, 38, 2014, 218-226.
9. J. Martínez-Moreno, C. Mura, V. Merino, A. Nácher, M. Climente, M. Merino-Sanjuán: *Study of the Influence of Bone Cement Type and Mixing Method on the Bioactivity and the Elution Kinetics of Ciprofloxacin*, J. Arthroplasty, 30(7), 2015, 1243-1249.
10. H. Tan, S. Guo, S. Yang, X. Xu, T. Tang: *Physical characterization and osteogenic activity of the quaternized chitosan-loaded PMMA bone cement*, Acta Biomater., 8(6), 2012, 2166-2174.
11. S.C. Shen, W.K. Ng, Y.-C. Dong, J. Ng, R.B.H. Tan: *Nanostructured material formulated acrylic bone cements with enhanced drug release*, Mater. Sci. Eng. C, 58, 2016, 233-241.
12. M. Miola, A. Bistolfi, M.C. Valsania, C. Bianco, G. Fucale, E. Verné: *Antibiotic-loaded acrylic bone cements: An in vitro study on the release mechanism and its efficacy*, Mater. Sci. Eng. C, 33(5), 2013, 3025-3032.
13. E. Paz, P. Sanz-Ruiz, J. Abenojar, J. Vaquero-Martín, F. Forriol, J.C. Del Real: *Evaluation of Elution and Mechanical Properties of High-Dose Antibiotic-Loaded Bone Cement: Comparative 'In Vitro' Study of the Influence of Vancomycin and Cefazolin*, J. Arthroplasty, 30(8), 1423-1429.
14. S.C. Shen, W.K. Ng, Y.-C. Dong, J. Ng, R.B.H. Tan: *Nanostructured material formulated acrylic bone cements with enhanced drug release*, Mater. Sci. Eng. C, 58, 2016, 233-241.
15. J. Slane, J. Vivanco, W. Rose, H.-L. Ploeg, M. Squire: *Mechanical, material, and antimicrobial properties of acrylic bone cement impregnated with silver nanoparticles*, Mater. Sci. Eng. C, 48, 2015, 188-196.
16. M. Miola, M. Bruno, G. Maina, G. Fucale, G. Lucchetta, E. Vernè: *Antibiotic-free composite bone cements with antibacterial and bioactive properties. A preliminary study*, Mater. Sci. Eng. C, 43, 2014, 65-75.
17. R. Ormsby, T. McNally, P. O'Hare, G. Burke, C. Mitchell, N. Dunne: *Fatigue and biocompatibility properties of a poly(methyl methacrylate) bone cement with multi-walled carbon nanotubes*, Acta Biomater., 8, 2012, 1201-1212.
18. T. Kokubo, H. Takadama: *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?*, Biomaterials, 27(15), 2006, 2907-2915.
19. C. Arcelloni, B. Comuzzi, R. Vaiani, R. Paroni: *Quantification of gentamicin in Mueller–Hinton agar by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 753(1), 2001, 151-156.
20. H. Li, J. Gu, L.A. Shah, M. Siddiq, J. Hu, X. Cai, D. Yang: *Bone cement based on vancomycin loaded mesoporous silica nanoparticle and calcium sulfate composites*, Mater. Sci. Eng. C, 49, 2015, 210-216.
21. Approved standard M2-A9, 2006.
22. Approved standard M7-A6, 2006.
23. N. Jeong, J. Park, K. Yoo, W. Kim, D.-H. Kim, S.-Y. Yoon: *Preparation, characterization, and in-vitro performance of novel injectable silanized-hydroxypropyl methylcellulose/phase-transformed calcium phosphate composite bone cements*, Curr. Appl. Phys., 16(11), 2016, 1523-1532.
24. S.Y. Kim, S.H. Jeon: *Setting properties, mechanical strength and in vivo evaluation of calcium phosphate-based bone cements*, J. Ind. Eng. Chem., 18(1), 2012, 128-136.
25. D.J.F. Moojen, H.C. Vogely, A. Fleer, A.J. Verbout, R.M. Castelein, W.J.A. Dhert: *No efficacy of silver bone cement in the prevention of methicillin- sensitive Staphylococcal infections in a rabbit contaminated implant bed model*, J. Orthop. Res., 27(8), 2009, 1002-1007.

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl