

Polylaktidi (96L/4D) -verkon kudosityhteensopivuus
rotan subkutiksessa

Pro gradu -tutkielma
Tampereen yliopisto
Lääketieteellisen teknologian instituutti
Toukokuu 2008
Sari Tamminen

Kiitokset

Tämä *Pro gradu* -tutkielma on laadittu Histola Research Oy:n, Scaffdex Oy:n ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteistyöprojektin pohjalta.

Haluan kiittää Scaffdexin Tuija Annalaa ja Histolan Pia Kivijärveä, että sain mahdollisuuden osallistua näin haastavaan ja mielenkiintoiseen tutkimusprojektiin. Haluan lämpimästi kiittää myös professori Minna Kellomäkeä ja dosentti Immo Rantalaan asiantuntevista neuvoista ja väitöskirjatutkija Teemu Lämsää saamastani korvaamattomasta avusta. Kaunis kiitos kuuluu erityisesti ohjaajalleni Tuija Annalalle, joka jakoi lukea ja tarkistaa raakaversioni kerta toisensa jälkeen. Suurin kiitos kuuluu perheelleni Jarnolle ja Aatulle. Ilman heidän tukeaan tämä ei olisi ollut mahdollista.

Tampere, toukokuu 2008

Sari Tamminen

PRO GRADU -TUTKIELMA

Paikka: TAMPEREEN YLIOPISTO
Lääketieteellinen tiedekunta
Lääketieteellisen teknologian instituutti (IMT)
Tekijä: TAMMINEN, SARI SOFIA
Otsikko: Polylaktidi (96L/4D) -verkon kudosityhteensopivuus rotan subkutiksessa
Sivumäärä: 49
Ohjaaja: DI Tuija Annala, professori Minna Kellomäki, dosentti Immo Rantala
Tarkastajat: Professori Markku Kulomaa, DI Tuija Annala
Aika: toukokuu 2008

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksen tausta ja tavoitteet: Erilaisten elimistöön asetettavien vierasesineiden, kuten implanttien ja kehon erilaisten varaosien määrä on suuressa kasvussa. Tästä syystä myös vierasesinereaktioiden ja -infektioiden määrä on kasvanut merkittävästi.

Leikkausalueen infektiota hoidetaan yleensä oraalisesti antibiooteilla. Antibiootit eivät kuitenkaan tuo riittävää apua vierasesineen yhteydessä, koska implantin pinta tarjoaa bakteereille edullisen kasvualustan ja kehon immuunipuolustus (opsonisaatio ja fagocytoosi) on häiriintynyt vierasesineen läsnäolosta. Antibioottilääkityksen haittoina ovat myös resistenssi-ongelmat.

Hopea on tutkimusten myötä osoittautunut pienissä pitoisuuksissa antimikrobiseksi aineeksi. Sen on todettu tuhoavan tehokkaasti Gram -positiivisia ja Gram -negatiivisia bakteereja sekä hiiva- ja homesieniä. Hopea on mielenkiintoinen implanttimateriaalin osana, koska sen antimikrobinen ominaisuus ei kärsi gammasteriloinnissa, eikä sille voi muodostua resistenssiä.

Tämän tutkielman päätavoitteena oli selvittää gammasteriloidun biohajoavan polylaktidi (96L/4D) -verkon bioyhteensopivuus ja turvallisuus elävässä kudoksessa. Biohajoava verkkomateriaali oli joko puhdasta poly-96L/4D-laktidia tai poly-96L/4D-laktidia, joka sisälsi 0,5 tai 2 paino- % antimikrobista hopeaa. Toisena tavoitteena oli selvittää, onko antimikrobisella hopealla havaittava vaikutus paikalliseen kudoksetuhoon. Jatkotavoitteena oli antaa arvio, kumpi pitoisuus 0,5 paino- % vai 2 paino- % lisättyä antimikrobista hopeaa on vaikutuksiltaan optimaalisempi. Tavoitteena oli myös seurata materiaalien makroskooppista hajoamista.

Tutkimusmenetelmät: 18 Sprague-Dawley urosrotan selän ihonalaiskudokseen implantoitiin neljä gammasteriloitua biomateriaalia. Näytteenotto suoritettiin 1 viikon, 3 ja 6 kuukauden seuranta-ajan jälkeen. Kudoksenäytteet tutkittiin histologisesti. Tutkittuja kudosityhteensopivuutta kuvaavia histologisia parametrejä olivat ödeema, tulehdusreaktio ja sidekudoksen muodostuminen. Tulokset käsiteltiin tilastollisesti.

Tutkimustulokset: Materiaalien aiheuttamat histologiset muutokset vaihtelivat lievästä kohtalaisiin. Histologisten parametrien erot testimateriaalien välillä olivat varsin pieniä ja tilastolliset erot vähenivät seuranta-ajan myötä. Yleisimmin erot esiintyivät saman materiaalin eri aikapisteiden välillä. Yhden viikon ja 3 kuukauden aikapisteissä testimateriaaleista ei löytynyt biohajoamisen merkkejä. Hajoamista edeltävää polylaktidien pehmentymistä havaittiin 6 kuukauden aikapisteessä. Tässä tutkimuksessa ei voitu osoittaa, että hopea vähentäisi ödeemaa, tulehdusta tai sidekudoksen muodostumista.

Johtopäätökset: Tutkimustulosten perusteella jokaista testattua materiaalia voidaan pitää kudosityhteensopivana ja turvallisena rotan subkutiksessa. Koska hopean antimikrobisista ominaisuuksista on vahvaa näyttöä, hopean pitoisuus saattoi olla kudolosuhteisiin nähden liian vähäinen tai mahdollisesti hopea toimii paremmin pinnoitteena kuin jakautuneena koko matriisin alueelle. Toisaalta hopea saattoi vähentää leikkaushaavan mikrobeja, mutta sen vaikutus ei ollut erotettavissa vierasesinereaktiosta. Biohajoaminen oli käynnistynyt 6 kuukauden aikapisteeseen mennessä.

MASTER'S THESIS

Place: UNIVERSITY OF TAMPERE,
Faculty of Medicine
Institute of Medical Technology (IMT)
Author: TAMMINEN, SARI SOFIA
Title: Biocompatibility of polylactide (96L/4D) -mesh in the rat subcutis
Pages: 49
Supervisor: DI Tuija Annala, Professor Minna Kellomäki, Docent Immo Rantala
Reviewers: Professor Markku Kulomaa, DI Tuija Annala
Date: May 2008

ABSTRACT

Background and aims: Amount of surgical operations for different foreign body materials, like implants and prosthesis, has considerably increased. So are the risk of foreign body reactions and infections.

Normally foreign body infections are treated with antibiotics but in most cases systemic antibiotics do not provide effective treatment for infections with foreign body material. Microbes can easily colonize to the surface of the biomaterial and create a protective biofilm when immuneresponse (opsonisation and fagocytosis) is disturbed. Drawback is also possible antibiotic resistance.

Silver is shown to have an antibacterial activity when it is added low concentrations to the infection area. Studies indicate that silver inhibites bacterial growth and colonization and also destroys Gram -positive and Gram -negative bacteria and fungi. Silver is potential antibacterial agent in the implant applications because it won't lose effectiveness in gammasterilization and won't develop resistance.

The primary aim of this study was to evaluate the biocompatibility and biological safety of the gammasterilized biodegradable polylactide (96L/4D) -mesh with (0,5 w-% or 2 w-%) and without an antibacterial silver. Secondary aim was to determine wheather silver has effects on surrouding tissue. The intention was also to evaluate which amount of added antibacterial silver is more optimal. One aim was to evaluate macroscopic resorption of the polylactides.

Methods: Under general anesthesia, 18 Sprague-Dawley male rats received four implants to the dorsal subcutaneous tissue. Animals were sacrificed after 1, 12 and 24 weeks. Tissue samples were examined histologically. Examined histological parameters were edema, inflammation and fibrosis. The data was evaluated statistically.

Results: Histological changes induced by test materials vary from mild to moderate. Overall, differences between the test materials were observed slight and the amount of statistically relevant changes decreased by the time. In general, significant changes were seen between the time points in the same material. There were no signs of degradation in any of the implant materials tested at the 1 week and 3 months time points. A slight softening of polylactide texture was seen at the 6 months time point. In this research the addition of silver did not result any significant reduction in edema, inflammation or fibrosis.

Conclusions: According to results, testmaterials can consider to be biocompatible and biologically safe in the rat subcutis. There are strong evidences for antimicrobial

properties of silver, so the percentage of silver in tissue environment might have been too low. Silver may also work better when it is added to the sheet part of the material. On the other hand, silver could have eliminated microbes but the influence was not distinguished from the foreign body reactions. Biodegradation was started up to the 6 months time point.

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	10
2	KIRJALLISUUSKATSAUS	11
2.1	BIOHAJOAVAT POLYMEERIT.....	11
2.2	BIOHAJOAVIEN POLYMEERIEEN HAJOAMINEN KUDOSYMPÄRISTÖSSÄ.....	12
2.2.1	<i>Hydrolyyttiset hajoamisprosessit</i>	13
2.2.2	<i>Fysikaaliset hajoamismekanismit</i>	14
2.2.3	<i>Kemialliset hajoamismekanismit</i>	14
2.2.4	<i>Entsyyttiset hajoamismekanismit</i>	15
2.3	POLYMEERIT LÄÄKETIETEEN SOVELLUKSISSA.....	16
2.3.1	<i>Lääketieteelliset biohajoavat polymeeripohjaiset implantit</i>	16
2.4	POLYLAKTIDIT.....	17
2.4.1	<i>Valmistus</i>	18
2.4.2	<i>Polylyktidien biohajoavat sovelluskohteet</i>	19
2.4.3	<i>Polylyktidien hajoaminen kudosisympäristössä</i>	20
2.5	VIERASESINEINFEKTIOT.....	21
2.5.1	<i>Leikkaushaavan mikrobi-infektio</i>	22
2.6	AKTIIVISET IMPLANTIT.....	22
2.6.1	<i>Hopea antimikrobisena aineena</i>	24
2.7	BIOYHTEENSOPIVUUS.....	26
2.7.1	<i>Materiaalin ja kudoksen rajapinnalla tapahtuvat reaktiot</i>	27
2.7.2	<i>Biomateriaalien aiheuttamat kudosisvasteet</i>	28
2.7.3	<i>Polyestereiden kudosisyhteensopivuus</i>	30
3	TUTKIELMAN TAUSTA JA TAVOITTEET	31
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	32
4.1	KOE-ELÄIMET.....	32
4.2	IMPLANTOIDUT MATERIAALIT.....	32
4.3	IMPLANTOINTI.....	32
4.4	SEURANTA.....	33
4.5	NÄYTTEENOTTO.....	34
4.6	HISTOLOGIA.....	34
4.7	KUDOSVASTEEN JA BIOHAJOAMISEN MAKROSKOOPPINEN TARKASTELU.....	34
4.8	MIKROSKOPOINTI.....	34
4.8.1	<i>Sokkoutus</i>	34
4.8.2	<i>Mikroskooppiset parametrit ja pisteytys</i>	35
4.9	TILASTOLLINEN ANALYYSI.....	35
5	TULOKSET	36
5.1	HISTOLOGIA.....	36
5.1.1	<i>Ödeema</i>	36
5.1.2	<i>Tulehdus</i>	37
5.1.3	<i>Sidekudoksen muodostuminen</i>	39
5.2	ANTIMIKROBISEN HOPEAN VAIKUTUKSET KUDOSREAKTIOON.....	40
5.3	MATERIAALIEN MAKROSKOOPPINEN TARKASTELU.....	40
5.4	KOE-ELÄINTEN TERVEYDEN SEURANTA JA PAINON KEHITYS.....	40

6	POHDINTA	42
6.1	HISTOLOGISET PARAMETRIT (TULEHDUS, ÖDEEMA JA SIDEKUDOS)	42
6.2	ANTIMIKROBISEN HOPEAN VAIKUTUKSET KUDOSREAKTIOON.....	44
6.3	MATERIAALIEN MAKROSKOOPPINEN TARKASTELU	45
7	JOHTOPÄÄTÖKSET	46
	LÄHDELUETTELO.....	47

Lyhenteet

ATP	adenosiinitrifosfaatti
HDPE	korkeatiheksinen polyeteeni
MRSA	metisilliiniresistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
PCL	polykaprolaktoni
PLA	polylaktidi, polymaitohappo
P(D)LA	homopolymeerinen D-polylaktidi
P(L)LA	homopolymeerinen L-polylaktidi
P(L/D)LA	stereokopolymeerinen L- ja D -polylaktidi
PLA (96L/4D)	polylaktidi (96 mol- % L- ja 4 mol- % D-stereoisomeeriä)
PLA (96L/4D) + 0,5 %	polylaktidi (96 mol- % L- ja 4 mol- % D-stereoisomeeriä) + 0,5 paino- % hopeaa
PLA (96L/4D) + 2 %	polylaktidi (96 mol- % L- ja 4 mol- % D-stereoisomeeriä) + 2 paino- % hopeaa
PLGA	maitohapon ja glykolihapon kopolymeeri
PGA	polyglykolidi, polyglykolihappo
PMMA	polymetyylimetakrylaatti
PTFE	polytetrafluorieteeni
VRE	vankomysiiniresistentti <i>Enterococcus</i>

Lukijalle:

Suomenkieli ei sisällä erillisiä ilmaisuja englannin kielisille sanoille inflammation ja infection. Inflammation (eng.) viittaa esim. vierasesineen aiheuttamaan tulehdusreaktioon kudoksessa, joka kuuluu normaaliin kehon puolustusreaktioon. Infection (eng.) viittaa taas mikrobiperäiseen tulehdukseen. Tästä syystä kirjoittaja käyttää vierasesinereaktion ja kudoksen paranemisprosessin yhteydessä joko ilmaisua tulehdus tai vierasesinereaktio ja mikrobien aiheuttaman tulehduksen yhteydessä ilmaisua infektio.

1 Johdanto

Erilaisten elimistöön asetettavien vierasesineiden, kuten implanttien ja kehon erilaisten varaosien (tekonivelet ym.) määrä on suuressa kasvussa. Tästä syystä myös vierasesineiden aiheuttaminen vierasesinereaktioiden ja infektioiden osuus on kasvanut merkittävästi. Kun kudoksessa on vierasta materiaalia, normaalia pienempi bakteerimäärä johtaa infekioon (Repo, 1986). Implantoinnin yhteydessä kehoon voi joutua mikrobeja esim. ilmateitse, potilaan ihosta, leikkausvälineistä tai itse vierasesineen kautta. Leikkausalueen infektio voi olla pinnallinen ja helposti hoidettavissa, mutta toisinaan leikkausalueen infektio voi olla hengenvaarallinen, varsinkin, jos kehoon on jätetty vierasesine (Haukipuro, 1996). Erityisesti tekonivelleikkauksissa, leikkaushaavan infektio voi mitätöidä koko leikkaustuloksen.

Leikkausalueen infektoita hoidetaan yleensä oraalisesti antibiooteilla, mutta vaihtoehtona on myös injektoida antibioottia leikkausalueelle. Antibiootteja käytetään myös aktiivisten implanttien osana (Jukarainen & Strömberg, 2004; Waris ym., 2004). Antibiootit eivät kuitenkaan tuo riittävää apua vierasesineen yhteydessä, sillä implantin pinta tarjoaa bakteereille edullisen kasvualustan ja kehon immuunipuolustus (opsonisaatio ja fagosytoosi) on häiriintynyt vierasesineen läsnäolosta. Antibioottilääkityksen haittana ovat myös mahdolliset resistenssiongelmat. Tutkimus ja kehitys tähtäävät tällä hetkellä vierasesineiden mahdollisen vähäiseen infektiotiteuteen, koska leikkaushaavan infektio on yleisin syy kudoksen epätäydelliseen ja viivästyneeseen parantumiseen (Haukipuro, 1996).

Hopea on tutkimusten myötä osoittautunut pienissä pitoisuuksissa antimikrobiseksi aineeksi. Sen on todettu tuhoavan tehokkaasti Gram -positiivisia ja Gram -negatiivisia bakteereja sekä hiiva- ja homesieniä. Edellä mainitun ominaisuuden lisäksi hopea on kiinnostava antimikrobisena aineena, koska sille ei voi muodostua resistenssiä. Hopea on potentiaalinen antimikrobinen aine myös implanttisovelluksiin, koska se kestää myös gammasterilointia vastoin kuin antibiootit tai monet muut antimikrobiset aineet. Gammasterilointi on yksi luotettavimmista implanttien sterilointimenetelmistä, mutta sen heikkoutena on se, että se saattaa tuhota tai muuttaa materiaalien ja aktiiviaineiden ominaisuuksia.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Biohajoavat polymeerit

Biohajoavat polymeerit voidaan luokitella monella tavalla. Tyypillisimmin biohajoavat polymeerit luokitellaan synteettisiin ja luonnon polymeereihin. Valtaosa synteettisistä polymeereistä on alifaattisia polyestereitä, jotka ovat tunnetuimpia biohajoavia polymeerejä. Näihin kuuluvat esimerkiksi polylaktidit (PLA), polyglykolidit (PGA) ja Poly- ϵ -kaprolaktonit (PCL) (Kellomäki, 2000). Alifaattisista polyestereistä käytetyimpiä ovat ehdottomasti polylaktidit (PLA) ja polyglykolidit (PGA) sekä edellisten kopolymeerit. Alifaattisten polyestereiden lisäksi synteettisiin polymeereihin luetaan mm. polyesterieetterit, polyesteriamidit, polyesterikarbonaattit ja polyesteriuretaanit. Luonnonperäisiin biohajoaviin polymeereihin kuuluu puolestaan mm. proteiiniperäiset albumiini ja kollageeni sekä hiilihydraattiperäiset kitini, kitosaani, tärkkelys, selluloosa ja hyaluronihappo. (Kellomäki, 2000.)

Biohajoavat polymeerit voidaan luokitella alkuperänsä lisäksi biohajoamistapansa mukaan. Biohajoavat polymeerit voivat olla joko hydrolyyttisesti tai entsyymattisesti hajoavia tai yksityiskohtaisemmin bulkkieroosiolla tai pintaeroosiolla hajoavia. Tyypillisesti biohajoavat polymeerit hajoavat elimistössä hydrolyyttisesti eli veden vaikutuksesta (Kellomäki, 2000), koska niiden pääketjun rakenne sisältää runsaasti hydrolyysille alttiita happi- ja typpi-atomeja. Polymeerin rakenteesta riippuen biohajominen voi olla osin myös entsyymattista (Waris ym., 2004). Ympäristötekijöillä, kuten lämpötilalla ja pH:lla on myös vaikutus hydrolyysialttiuteen (Kellomäki, 2000). Biohajoavat polymeerit menettävät mekaaniset ominaisuutensa tyypillisesti muutamassa kuukaudessa ja häviävät elimistössä parin vuoden kuluessa. Biohajoavien polymeerien hajoamisnopeutta voidaan säädellä monilla tavoin jopa kuukausista vuosiin. (Waris ym., 2004.)

Biohajoavilla polymeereillä on lukuisia sovelluskohteita. Massatuotannossa näitä voidaan käyttää mm. pakkausmateriaaleina ja kertakäyttötavaroiden raaka-aineina. Biohajoavat polymeereillä on runsaasti sovelluskohteita myös lääke- ja biotieteissä. Lääketeknologiassa biohajoavia polymeerejä käytetään implanttimateriaaleina,

kontrolloidussa lääkeluovutussysteemeissä, kudosteknologiassa sekä biohajoavissa ommelangoissa (Dee ym., 2002). Useita biohajoaviin polymeereihin perustuvia sovellutuksia on jo kaupallisesti saatavilla, mutta tutkimus näiden potentiaalisten materiaalien osalta jatkuu ja uusilla ominaisuuksilla varustettuja käyttökohteita tulee jatkuvasti lisää.

2.2 Biohajoavien polymeerien hajoaminen kudossympäristössä

Lääketieteellisissä sovelluksissa, kudossympäristössä, biohajoavan polymeerin täytyy kestää elimistön aiheuttamaa mekaanista, fysikaalista ja kemiallista stressiä halutun ajan. Tämän jälkeen polymeerin tulee hajota hallitusti ja lopulta hävitä elimistöstä jättämättä materiaaliperäisiä jäämiä (An ym., 2000).

Biohajoava polymeeri hajoaa kudossympäristössä pääosin hydrolyyttisesti eli veden vaikutuksesta. Polymeerin rakenteesta riippuen myös entsyymit voivat kiihdyttää biohajoamista. (An ym., 2000; Kellomäki, 2000; Li ym., 2000; Seppälä ym., 2004; Waris ym., 2004.) Hydrolyysialttiuteen vaikuttavat monet tekijät. Biohajoavuus riippuu mm. polymeerin kemiallisesta rakenteesta, moolimassasta, kiteisyydestä ja hydrofiilisyydestä. Pinnan laatu, kappaleen muoto ja huokoisuus, sterilointimenetelmä, epäpuhtaudet sekä implantointipaikka kehossa vaikuttavat myös hajoamisalttiuteen. (An ym., 2000; Kellomäki, 2000.) Ympäristötekijöillä, kuten lämpötilalla ja pH:lla on myös havaittava vaikutus hydrolyysiin (Li & McCarthy, 1999; Kellomäki, 2000). Lämpötilan nosto nopeuttaa ja pH:n lasku hidastaa hydrolyysiä (Li & McCarthy, 1999).

Biohajoavan materiaalin hajoamisen esimerkkejä ovat mekaanisten ominaisuuksien heikkeneminen. Hydrolyysin edetessä materiaali hajoaa pienemmiksi partikkeliksi ja lopulta aineenvaihdunnan kautta metaboloituviksi monomeereiksi. (Waris ym., 2004.) Hydrolyyttistä hajoamista on selkeää tarkastella fysikaaliselta, kemialliselta ja entsyymaattiselta kannalta.

2.2.1 Hydrolyyttiset hajoamisprosessit

Hydrolyyttisellä hajoamisella tarkoitetaan biohajoavan polymeerin kemiallisten sidosten katkeamista veden vaikutuksesta. Polymeerien hydrolyyttinen hajoaminen koostuu neljästä eri vaiheesta (Taulukko 1). Hydrolyyttinen hajoamisprosessi käynnistyy heti, kun polymeeri asetetaan kehoon.

Hydrolyyttisen hajoamisen ensimmäisessä vaiheessa, veden tunkeutuessa rakenteeseen, polymeerin tertiääri- ja sekundäärirakenne purkautuu osittain sekundäärisidosten, kuten van der Waalsin voimien ja vetysidosten katkeamisen myötä. Kovalenttisten sidosten katkeamista ei juuri havaita hydrolyysin tässä vaiheessa. Tämä veden absorboitumisvaihe kestää arviolta minuuteista tunteihin riippuen pääosin polymeerin koosta. Mitä suurempi kappale on, sitä pidempään veden tunkeutuminen kestää. (Kronenthal ym., 1975.)

Veden tunkeutuessa yhä syvemmälle rakenteeseen myös rakennetta koossa pitävät kovalenttiset sidokset alkavat pilkkoutua. Tämä hydrolyyttisen hajoamisen toinen vaihe havaitaan mekaanisten ominaisuuksien heikkenemisenä, materiaalin pehmenemisenä ja moolimassan vähenemisenä. Materiaalin massa säilyy kuitenkin alkuarvossaan. Tässä vaiheessa myös entsyymit osallistuvat polymeerin pilkkoutumiseen. Mekaanisten ominaisuuksien heikkeneminen on riippuvainen myös lämpötilasta ja pH-arvosta. (Kronenthal ym., 1975.)

Hydrolyysin kolmas vaihe havaitaan polymeerin massan pienenemisenä (Kronenthal ym., 1975). Tätä vaihetta voidaan pitää toisen vaiheen jatkona, jonka täytyy edetä riittävän pitkälle, että hydrolyysin viimeinen vaihe voi alkaa.

Hydrolyyttisen hajoamisen viimeisessä vaiheessa polymeeri pilkkoutuu lopulta pieniksi partikkeleiksi, jotka päätyvät opsonisaation ja fagosytoosin kohteiksi. Polymeeriperäiset oligo- ja monomeerit osallistuvat solujen aineenvaihduntaan ja Krebsin syklin, elektroninsiirtoketjun ja oksidatiivisen fosforylaation kautta niistä muodostuu ATP:tä, hiilidioksidia ja vettä. (Kronenthal ym., 1975; Arshady, 2003.)

Taulukko 1. *Polymeerin hydrolyyttinen hajoaminen vaiheittain*

1. Veden diffuusio polymeeriin → sekundäärisidosten katkeaminen
2. Polymeerin kovalenttisten sidosten katkeaminen → moolimassan pieneneminen
3. Polymeerin massan väheneminen
4. Polymeerin lopullinen hajoaminen monomeereiksi → CO ₂ ja H ₂ O

2.2.2 Fysikaaliset hajoamismekanismit

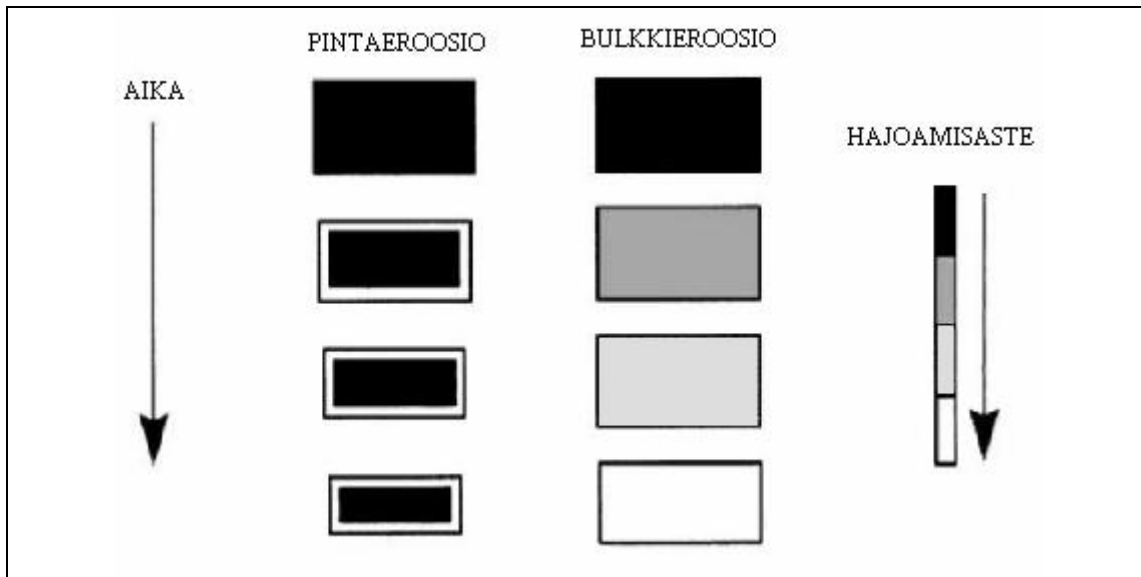
Fysikaalisesti tarkasteltaessa hajoamismekanismit voidaan jakaa pintaerodoituviiin eli pinnalta hajoaviin ja bulkkierodoituviiin eli kauttaaltaan hajoaviin mekanismeihin (Kuva 1) (Middleton & Tipton, 1998; Kellomäki, 2000). Tämä jako perustuu siihen, onko veden diffuusio polymeeriin vai polymeerin hajoaminen nopeampaa.

Hydrofiilisillä polymeereillä, kuten polyestereillä, nesteen tunkeutuminen materiaaliin on nopeaa. Tällöin neste läpäisee materiaalin kauttaaltaan ja hajoaminen tapahtuu bulkkierosiolla koko kappaleessa samanaikaisesti. Bulkkierodoituvien polymeerien moolimassa pienenee heti hydrolyysin alusta lähtien. (Middleton & Tipton, 1998; Kellomäki, 2000.)

Hydrofobiset polymeerit, kuten polyanhydritit, suosivat puolestaan pintaeroosiota. Pintaerodoituvilla polymeereillä nesteen tunkeutumisenopeus on päinvastoin hitaampaa kuin hajoaminen. Vesi ei ehdi tunkeutua materiaaliin, vaan hajoaminen alkaa heti. Tämä havaitaan materiaalin koon ja massan pienenemisenä, mutta moolimassa säilyy lähes alkuarvossaan. Pintaeroosion katsotaan olevan biomateriaalin kannalta optimaalisiin tilanne, sillä materiaali säilyttää vahvuutensa pitkään ja lopulta häviää murentumatta. (Middleton & Tipton, 1998; Kellomäki, 2000; Li ym., 2000.)

2.2.3 Kemialliset hajoamismekanismit

Hydrolyyttistä hajoamista voidaan tarkastella myös kemialliselta kannalta, jolloin tarkastelu keskittyy polymeerin kemiallisissa sidoksissa tapahtuviin muutoksiin. Kemiallisen tarkastelutavan mukaan hydrolyyttiset hajoamismekanismit voidaan jakaa kolmeen päätyyppiin riippuen siitä, onko katkaistavana ristisilta, sivuketju vai pääketju.



Kuva 1. Biohajoavien polymeerien hydrolyyttinen hajoaminen tapahtuu pinta- tai bulkkieroosiolla. Kuva on muokattu Laukkasen, 2007 kuvasta.

Synteettisten biohajoavien polymeerien kohdalla hydrolyyttinen hajoaminen tapahtuu pääosin pääketjun katkeamisen kautta. (Niiranen, 2005.) Polymeerin pääketjua yhdistävät sidokset (esteri, amidi, jne.) kestävät hydrolyysiä eri tavoin. Esimerkiksi polymeerin anhydridisidokset ovat herkempiä kuin esterisidokset, jotka taas ovat heikompia kuin amidisidokset (Middleton & Tipton, 1998; Niiranen, 2005). Biohajoavasta polymeeristä valmistetun implantin hajoamisnopeus ei ole pääteltävissä yksinomaan pääketjun rakenteen perusteella. Samasta materiaalista valmistetuilla implanteilla hajoamisnopeudet vaihtelevat paljon riippuen implantin valmistuksessa käytetyistä menetelmistä. Esimerkiksi polymerointi-, puhdistus-, työstö- ja sterilointimenetelmien on havaittu vaikuttavan biohajoavuuteen (Kellomäki, 2000).

2.2.4 Entsymaattiset hajoamismekanismit

Biohajoavat polymeerit voivat hydrolysoitua joko passiivisesti tai entsyymien avulla (An ym., 2000; Kellomäki, 2000; Li ym., 2000; Ashammakhi ym., 2003; Seppälä ym., 2004; Waris ym., 2004). Entsyymit toimivat kemiallisten katalyyttien tavoin madaltamalla hydrolyysin vaatimaa aktivaatioenergiaa. Hydrolyyttiset entsyymit kiihdyttävät hajoamista, mutta ne eivät yksinään pysty hajottamaan polymeeriä. Ne edistävät vain polymeerin ns. pintahajoamista, sillä ne eivät pysty diffundoitumaan polymeerin sisäosiin. Entsymaattiset hajoamismekanismit ovat tehokkaimmillaan luonnonpolymeerien kohdalla, mutta niillä on tärkeä rooli myös synteettisten polymeerien hydrolyysin katalysoijina.

Hydrolaasit ja proteaasit katalysoivat esterijä ja peptidisidosten hydrolyyseyjä. Hydrolyyseyä katalysoivia entsyymejä ovat myös esterisidosspesifiset esteraasit. Entsyymien aktiivisuus riippuu voimakkaasti ympäristön lämpötilasta ja pH:sta, mistä johtuen myös ympäristötekijöillä on merkittävä vaikutus materiaalien hydrolyysiin (Li & McCarthy, 1999).

2.3 Polymeerit lääketieteen sovelluksissa

Lääketieteellisissä biomateriaalisovelluksissa käytetään sekä biostabiileja että biohajoavia polymeerejä (Kellomäki, 2000; Seppälä ym., 2004). Biostabiili polymeeri säilyy kudolosuhteissa vuosikymmeniä lähes muuttumattomana. Implanttimateriaaleina yleisemmin käytettyjä biostabiileja polymeerejä ovat mm. korkeatiheyksinen polyeteeni (HDPE), polymetyylimetakrylaatti (PMMA) ja polytetrafluorieteeni (PTFE) (Kellomäki, 2000).

Usein biomateriaalin antamaa tukea tarvitaan elimistössä vain hetkellisesti, esimerkiksi silloin, kun hoidettava kudos pystyy uusiutumaan. Tällöin biohajoavasta polymeeristä valmistettu implantti on optimaalisempi vaihtoehto. Biohajoava implantti pystyy liukenemaan uudiskudoksen tieltä ja lopulta poistumaan elimistöstä aineenvaihdunnan kautta. Kudoksen paraneminen on nopeaa, eikä implantin poistamiseksi tarvita uutta leikkausta. (Waris ym., 2004.)

2.3.1 Lääketieteelliset biohajoavat polymeeripohjaiset implantit

Biohajoavien implanttien tehtävänä on tukea tai korvata kudoksia sen aikaa, kun kudoksen rakenne ja toiminta on häiriintynyt kudოსvaurion jäljiltä. Kudoksen parantumisen myötä biohajoava implantti metaboloituu elimistöstä vähitellen ja implantti korvautuu uudiskudoksella. Useimmat biohajoavat implantit valmistetaan alifaattisista polyestereistä (Seppälä ym., 2004). Ne ovat luonteeltaan passiivisia, eivätkä ne juuri reagoi ympäröivän kudoksen kanssa.

Biohajoavien polymeerien tyypillisimpiä lääketieteellisiä sovelluksia ovat ortopediset luuruuvit, -naulat, -nuolet, -nastat ja -levyt, haavaompeleet, kontrolloitu lääkeaineen

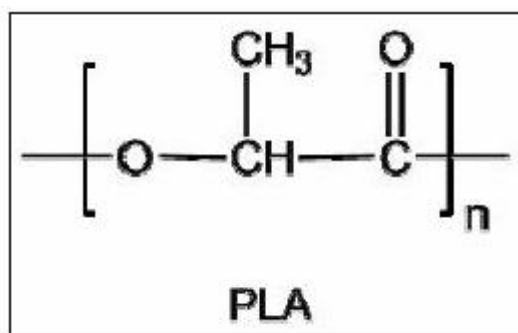
luovuttaminen sekä kudosteknologiset scaffoldit eli tukirakenteet (Dee ym., 2002; Törmälä ym., 2004; Waris ym., 2004).

Lääketieteellisten biohajoavien implanttien mekaanisten ja fysikaalisten ominaisuuksien täytyy säilyä riittävän pitkään, mutta myös heiketä hallitusti. Hajoamisnopeuden pitää olla juuri sopiva, eivätkä materiaalin mekaaniset ominaisuudet saa pettää liian varhain. Vaatimuksena on, että lääketieteellisten biohajoavien polymeerimateriaalien pitää olla kudos- ja veriyhteensopivia. Niistä valmistettavien implanttisovellusten, kuten esimerkiksi implanttimuodon sekä pintaominaisuuksien, pitää olla kokonaisuutena bioyhteensopivia. Niistä irtoavat hajoamistuotteet eivät myöskään saa olla toksisia eivätkä karsinogeenisiä. Niiden pitää olla työstettäviä, steriloitavia ja kontrolloidusti hajoavia.

Biohajoavien implanttien kudosityhteensopivuutta on pyritty parantamaan monilla tavoin. Implantteihin on lisätty mm. kasvutekijöitä, anti-inflammatorisia sekä antibakteerisia aineita. Näiden aineiden tarkoituksena on lisätä aktiivista vuorovaikutusta implanttimateriaalin ja kudoksen välille ja sitä kautta nopeuttaa kudoksen parantumista ja uudelleenkasvua. (Törmälä ym., 2004.) Normaalisti polymeeri toimii kudospäristössä sitä paremmin mitä tarkemmin sen ominaisuudet vastaavat ympäröivää kudosta.

2.4 Polylaktidit

Polylaktidit (Kuva 2) ovat tärkeimpiä synteettisiä biohajoavia polymeerejä. Ne kuuluvat alifaattisten polyestereiden ryhmään, joiden havaittiin olevan biohajoavia ja bioyhteensopivia jo 1960 -luvulla (Kulkarni ym., 1966 ja 1971, Kellomäen, 2000 mukaan).

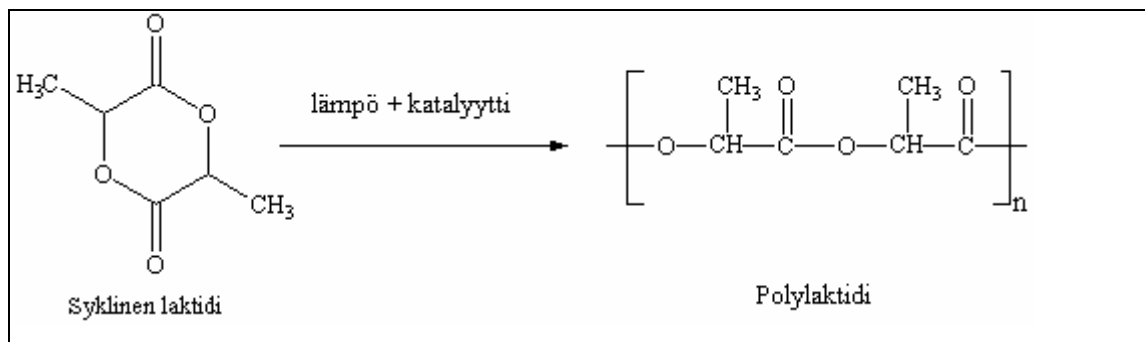


Kuva 2. Polylaktidien perusyksikkö (Laukkanen, 2007).

Polylaktidit ovat elimistön hyvin sietämiä biomateriaaleja, koska ne hajoavat elimistössä normaaleja metaboliareittejä pitkin soluravinteiksi. Polylaktidit ovat pääosin solu- ja kudosityhteensopivia materiaaleja, eivätkä ne aiheuta merkittäviä vierasesinereaktioita. Näistä ominaisuuksista johtuen polylaktidit ovat käytetyimpiä biohajoavia materiaaleja erilaisissa ortopedian, hammaslääketieteen, farmasian ja kirurgian sovelluksissa.

2.4.1 Valmistus

Pienen moolimassan polylaktideja voidaan valmistaa perinteisellä polykondensaatiolla. Suuren moolimassan polylaktideja valmistetaan puolestaan renkaanavauspolymerisaatiolla kahden maitohappomolekyylin muodostamasta syklisestä laktidista (Kuva 3) (Kellomäki, 2000; Li ym., 2000).

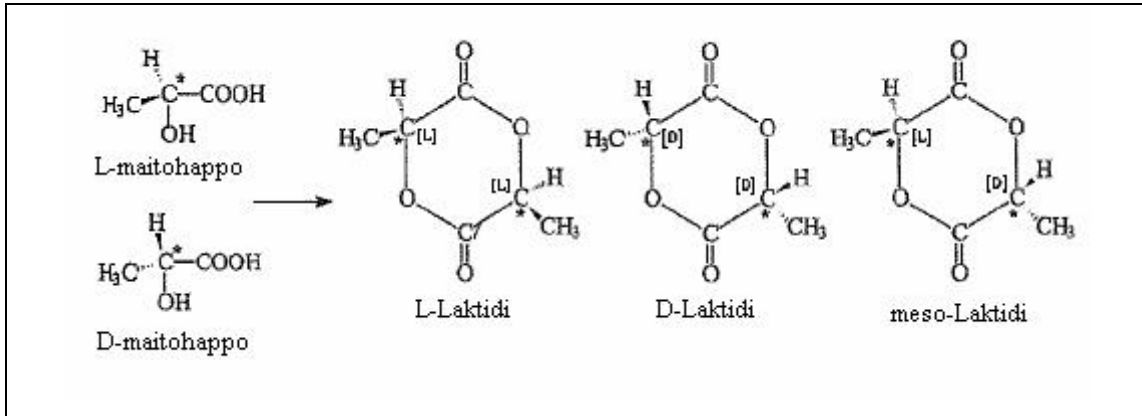


Kuva 3. Polylaktidin muodostuminen renkaanavauspolymerisaatiolla syklisestä laktidista. Kuva on muokattu Niirasen, 2005 alkuperäisestä kuvasta.

Laktidi voi muodostua joko kahdesta L-maitohaposta, kahdesta D-maitohaposta tai näiden yhdistelmästä. Ominaisuuksiltaan nämä L- ja D- maitohappoisomeerit (Kuva 4) ovat lähes samanlaisia, mutta ne kiertävät tasopolaroitua valoa vastakkaisiin suuntiin. Tästä syystä myös laktideilla esiintyy kolmentyyppistä optista aktiivisuutta, mistä johtuen niitä kutsutaan L-laktidiksi, D-laktidiksi ja meso-laktidiksi (Kuva 4) (Li ym., 2000).

Polylaktidien valmistuksessa käytetään kopolymeroinniksi kutsuttua menetelmää, jossa L- ja D- ja meso-laktideja polymeroidaan eri suhteissa. Kopolymeroinnilla pystytään muuttamaan polylaktidin ominaisuuksia haluttuun suuntaan ja vaikuttamaan polymeerien mekaanisiin ja fysikaalisiin ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi

hajoamisnopeuteen. Tunnettu ja tässäkin tutkimuksessa käytetty esimerkki kopolymeroimalla valmistetusta tuotteesta on poly-96L/4D-laktidi, jossa L- ja D-laktidin seossuhde on 96:4.



Kuva 4. L ja D -maitohappoisomeerit ja niistä muodostuvat L-, D- ja meso-laktidi. Kuva on muokattu Niirasen, 2005 alkuperäisestä kuvasta.

L-, D- ja mesolaktideista voidaan valmistaa hyvin vaihteleva joukko polylaktideja. Polylaktidien ominaisuudet määräytyvät pääosin niiden rakenteessa esiintyvien stereomuotojen mukaan. Homopolymeeriset polylaktidit, kuten P(L)LA ja P(D)LA, ovat kiteisiä ja järjestäytyneen rakenteensa vuoksi suhteellisen lujia ja hitaasti hajoavia polymeerejä. Amorfisen luonteen omaavat meso- ja D,L-laktidista eli ns. raseemisesta laktidista (seossuhteella 50:50) valmistetut polymeerit ovat puolestaan pehmeämpiä ja hajoavat edellisiä nopeammin. (Ashammakhi ym., 2003; Waris ym., 2004.)

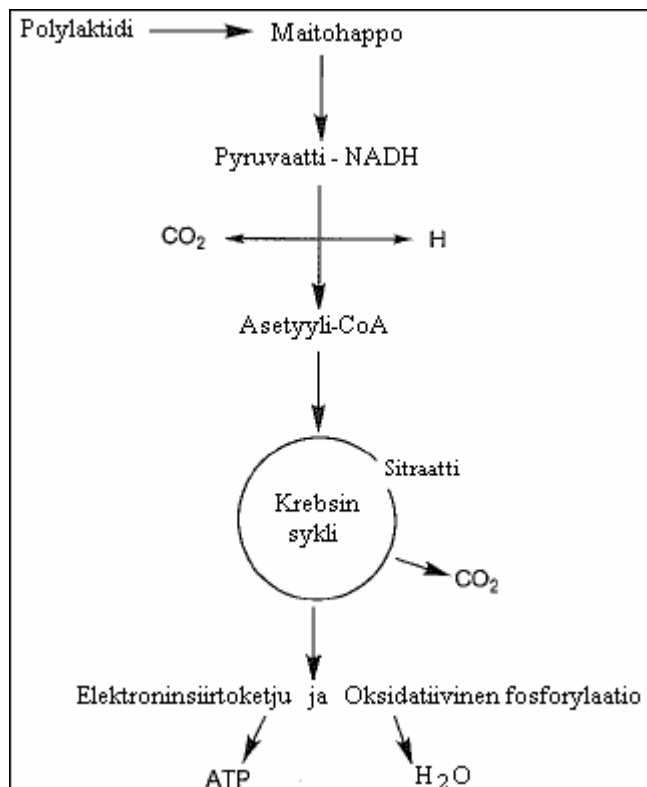
2.4.2 Polylaktidien biohajoavat sovelluskohteet

Polylaktidien ja sen kopolymerien tärkein sovellusalue on erilaiset ortopediset fiksaatiovälineet kuten ruuvit, naulat, nastat, nuolet ja levyt (Kellomäki, 2000; Törmälä ym., 2004; Waris ym., 2004). Polylaktideja käytetään myös sulavien ommellankojen valmistukseen sekä haavan sulkuhakasten ja niittien materiaalina (Kellomäki, 2000). Niistä on valmistettu väliaikaisia suojakalvoja ja verkkoja kirurgisiin tarkoituksiin (Waris ym., 2004). Polylaktidien yksi tärkeimmistä sovellusalueista on lääkeaineluovutussysteemit, joissa polylaktideja käytetään lääkkeiden kantajamatriiseina, jotka vapauttavat lääkettä kontrolloidusti hajoamisensa myötä. (Brannon-Peppas, 1997; Jukarainen & Strömberg, 2004.)

2.4.3 Polylaktidien hajoaminen kudospäristössä

Polylaktidit hajoavat elimistössä hydrolyyttisesti (Kellomäki, 2000; Li ym., 2000) veden ja lämmön vaikutuksesta maitohapoksi, joka pilkkoutuu puryvaatiksi ja asetyylikoentsyymi A:ksi ja hajoaa lopulta Krebsin syklin kautta vedeksi ja hiilidioksidiksi (Kuva 5) (Arshady, 2003). Entsyymien, kuten proteinaasi K:n, on todettu kiihdyttävän polylaktidien hajoamista (Li ym., 2000). Tarkemmin määritellen polylaktidit hajoavat bulkkieroosiolla eli kauttaaltaan (Kellomäki, 2000; Li ym., 2000).

P(L)LA:sta valmistetut implantit liukenevat kiteisyytensä ja hydrofiilisyytensä vuoksi hyvin hitaasti. Polylaktidin LD-muoto P(L/D)LA on mekaanisilta ominaisuuksiltaan heikompi ja hajoaa nopeammin kuin L-muoto P(L)LA. (Li ym., 2000; Waris ym., 2004.) Polylaktidien täydellinen liukeneminen kestää huomattavasti kauemmin kuin lujuusominaisuuksien häviäminen. P(L)LA:n täydelliseen absorptioon tarvittava aika vaihtelee 32 viikosta yli neljään vuoteen ja P(L/D)LA:n 24 viikosta 18 kuukauteen. Tutkimamme materiaali poly-96L/4D-laktidi säilyttää mekaaniset ominaisuutensa 5-12 kuukautta ja täydellinen häviäminen elimistöstä tapahtuu 2-3 vuodessa. (Waris ym., 2004.)



Kuva 5. Polylaktidit hajoavat elimistössä hydrolyyttisesti maitohappomonomeereiksi, jotka pilkkoutuvat puryvaatiksi ja asetyylikoentsyymi A:ksi ja hajoavat lopulta Krebsin syklin kautta vedeksi ja hiilidioksidiksi. Kuva on muokattu kirjan kuvasta *Introduction to Polymeric Biomaterials* (Arshady, 2003).

2.5 Vierasesineinfektiot

Erilaisten elimistöön asetettavien vierasesineiden, kuten erilaisten implanttien ja tekonivelten määrä, on suuressa kasvussa. Tästä syystä myös vierasesineinfektioiden osuus on kasvanut merkittävästi. Esimerkiksi vuosittain 3 miljoonasta USA:ssa operoidusta keskuslaskimokatetrasta 850 000 infektoituu, joista 20 % on vakavia infektioita (Furno ym., 2004).

Leikkaushaavan infektio on yleisin syy kudoksen epätäydelliseen ja viivästyneeseen parantumiseen (Haukipuro, 1996). Leikkausalueen infektio voi olla pinnallinen ja helposti hoidettavissa, mutta toisinaan leikkausalueen infektio voi olla hengenvaarallinen, varsinkin, jos kehoon jätetty vierasesine (Haukipuro, 1996). Erityisesti tekonivelleikkauksissa, leikkaushaavan infektio voi mitätöidä koko leikkaustuloksen. Vaarana on, että pehmytkudoksessa pitkään ollut infektiopesäke leviää myös luukudokseen (Ritsilä, 1991).

Leikkaussalissa kontaminaatio on useimmiten ilmajälitteinen (Ritsilä, 1991). Leikkaushaavan kontaminaatio voi olla peräisin myös potilaan ihosta, leikkausvälineistä tai itse vierasesineestä (Repo, 1986; Harges ym., 2007). Vierasesineinfektion arvellaan usein saavan alkunsa mikrobien kontaminoimista ompeleista (Repo, 1986). Mikrobi voi kontaminoida vierasesineen leikkauksen yhteydessä tai myöhemmin satunnaisen bakteremian seurauksena eli verenkierrosta kulkeutuvien mikrobien kautta (Repo, 1986). Vierasesineiden yhteydessä yleisin infektion aiheuttaja on Stafylokokki. Erityisesti *Staphylococcus epidermis* on yleisimpiä vakavia infektioita aiheuttava bakteeri vierasesineiden yhteydessä. Infektioalttiuteen vaikuttaa vierasesineen lisäksi myös potilaan terveydentila, leikkausolosuhteet ja mikrobin virulenssitekijät. (Repo, 1986.)

Kun kudoksessa on vierasta materiaalia, normaalia pienempi bakteerimäärä johtaa infektiin. Tämä johtuu vierasesineen aiheuttamasta opsonisaation ja fagosytoosin häiriintymisestä. (Repo, 1986.) Infektio on yleinen vierasesineen yhteydessä erityisesti siksi, koska vierasesine tarjoaa bakteereille kiinnittymis- ja kasvualustan ja sitä kautta bakteereja suojaavan biofilmin muodostuminen helpottuu (Bosetti ym., 2002; Furno ym., 2004; Harges ym., 2007). Biofilmin sisällä bakteerit ovat suojassa fagosyyteiltä, komplementilta ja antibiooteilta. Bakteereja suojaavan biofilmin

muodostuminen on merkittävin syy, minkä vuoksi mikrobeja ei pystytä kokonaan tuhoamaan vierasesineen pinnalta antibioottien avulla. (Repo, 1986; Hardes ym., 2007.)

2.5.1 Leikkaushaavan mikrobi-infektio

Leikkaushaavan kliinisellä infektiolla, kontaminaatiolla ja kolonisaatiolla on merkityksellinen ero. Kontaminoitunut haava sisältää bakteereja, jotka eivät lisääny, eivätkä aiheuta kudonvaurioita tai hidasta kudoksen parantumista. Kolonisoituneesta haavasta löytyy lisääntyviä mikrobeja, jotka eivät aiheuta kudonvaurioita, eivätkä hidasta kudoksen parantumista. Kliinisessä haavainfektiossa esiintyy puolestaan tulehduksen klassiset merkit: punotus, turvotus, kuumotus ja kipu. (Juutilainen & Niemi, 2007.) Tämä on seurausta lisääntyvistä virulenteista bakteereista, jotka aiheuttavat leikkaushaavan mätimistä ja haavan parantumisen hidastumista.

Leikkaushaavan parantumisen on todettu hidastuvan, kun mikrobimäärä ylittää 10^5 kudosgrammaa kohden. Pienempikin bakteerimäärä saattaa synnyttää kliinisen infektion, mikäli kyseessä on virulentti bakteeri, kuten esimerkiksi jotkut streptokokkikannat. (Juutilainen & Niemi, 2007.) Erityisesti vierasesineen yhteydessä, kun immuunipuolustus on häiriintynyt, normaalia pienempi bakteerimäärä johtaa helposti infektiin (Repo, 1986). Vaikka bakteeriviljely osoittaisi leikkaushaavan sisältävän bakteereita, on silti varmistettava, että kyseessä todellinen kliininen infektio, ennen antibioottikuurin aloittamista. Tämä siksi, koska resistenssiongelmiensa lisäksi on todettu, että kroonisen haavan kontaminaatiota tai kolonisaatiota ei pitäisi hoitaa antibiooteilla, koska ne eivät nopeuta haavan parantumista (Alinovi ym., 1986, Juutilaisen & Niemen, 2007 mukaan).

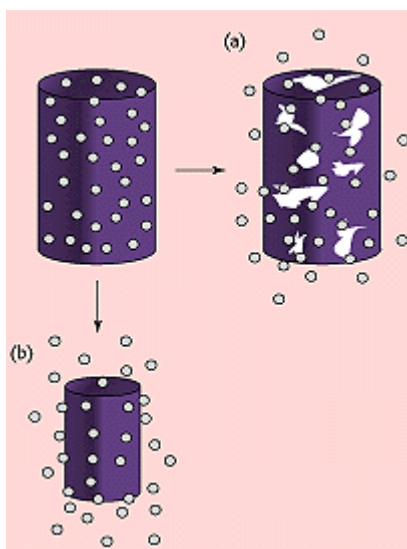
2.6 Aktiiviset implantit

Implanttien ominaisuuksia on jo jonkin aikaa pyritty parantamaan lisäämällä niihin aktiivisia lisäaineita, kuten lääkeaineita, kasvutekijöitä ja muita aktiiviaineita (Waris ym., 2004). Tavoitteena on aktivoida kehon omia paranemismekanismia ja näin ollen nopeuttaa kudoksen uusiutumista ja palautumista normaalitilaan. Tutkimus ja kehitystyö

tähtäävät erityisesti implanttien aiheuttaman tulehduksen ja mahdollisen infektion lieventämiseen ja sitä kautta kudoksen nopeampaan palautumiseen.

Aktiiviset implantit koostuvat kantajamatriisista tai kapselista ja sen sisältämästä aktiiviaineesta (Jukarainen & Strömberg, 2004). Useimmissa sovelluksissa peruskomponentteina ovat biohajoava polymeeri ja lääkeaine. Tällaisten ns. lääkeimplanttien etuina ovat lääkeaineen vapautuminen rajoitetulle alueelle, halutulla tavalla ja nopeudella (Seppälä ym., 2004). Toisin sanoen, lääkeimplantit vapauttavat lääkeainetta tasaisemmin kohdekudokseen tai verenkiertoon, eikä tyypillisiä oraaliseen lääkitykseen liittyviä pitoisuusvaihteluja esiinny. (Jukarainen & Strömberg, 2004.) Idea lääkeainetta luovuttavista biomateriaaleista ei suinkaan ole uusi, sillä se esitettiin ensimmäisen kerran yli 40 vuotta sitten (Ballard & Nelson, 1962, Jukaraisen & Strömbergin, 2004 mukaan).

Aktiiviaineet voivat olla pinnoitettuna tai seostettuna biohajoavaan polymeeriin sekä kapseloituna polymeerikalvon sisään (Seppälä ym., 2004). Sovelluksesta riippuen aktiiviaineet vapautuvat elimistöön joko diffuusiolla tai kantajapolymeerin hydrolyyttisen bulkki- tai pintaeroosion myötä (Kuva 6). Aktiiviaineen vapautumista säätelevät useat tekijät, kuten implantin pinta-ala, kalvon paksuus sekä aktiiviaineen pitoisuus, diffuusionopeus ja liukoisuus. (Jukarainen & Strömberg, 2004.) Monien aktiiviaineiden käyttöä rajoittaa niiden soveltumattomuus polymeerin vaatimiin käsittelyihin, kuten erilaisiin työstöihin ja sterilointeihin.



Kuva 6. Kaksi biohajoavaa implanttia, joissa lääkeaine on homogeenisesti polymeerissä.

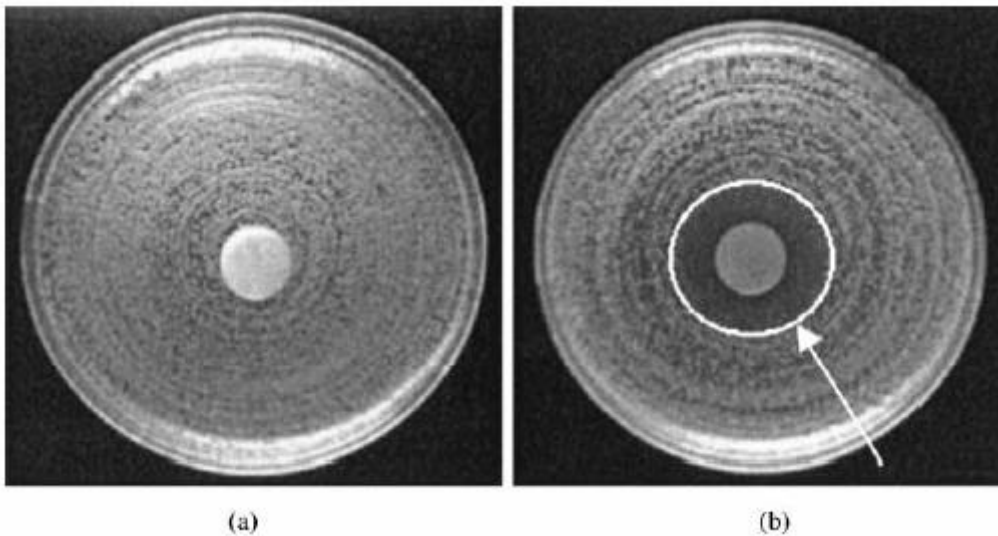
(a) Lääkeainetta vapautuu diffuusiolla polymeerin bulkkihajoamisen myötä (mm. polyesterit).

(b) Polymeerit, kuten polyanhydritit, hajoavat pintaeroosiolla, jolloin lääkeaine vapautuu vain erodoituvan pinnan kautta. (Brannon-Peppas, 1997.)

2.6.1 Hopea antimikrobisena aineena

Viime vuosisadan aikana tutkijat ovat pyrkineet kehittämään antimikrobisia aineita. Nykyään sairaalabakteerien ja antibioottiresistenssien yleistyttyä on tullut yhä tärkeämmäksi löytää turvallisia ja tehokkaita vaihtoehtoja mikrobien hallintaan.

Hopealla on jo pitkään tiedetty olevan antimikrobisia ominaisuuksia. Tutuimpia hopean käyttökohteita ovat palovammojen hoidossa käytetty hopeasulfadiatsiinivoide (Flamazine®) sekä antiseptinen hopeanitraatti (AgNO_3) eli laapis (Juutilainen & Niemi, 2007; Papp ym., 2007). Edellä mainittujen heikkoutena on niiden melko lyhyt vaikutusaika esim. siveltyinä haava-alueelle (Papp ym., 2007). Palovammojen ja haavanhoidossa jo vuosikymmenien ajan käytetty antimikrobinen hopea on löydetty uudelleen ja se saa jatkuvasti uusia sovelluskohteita mm. haavasidosten, aktiivisten kuitujen, implanttien ja proteesien osina. Uusissa kaupallisissa tuotteissa hopea yhdistetään monella tavalla erilaisiin kantajamateriaaleihin. Hopeaa käytetään mm. pinnoitteena tai sen annetaan vapautua rakenteen sisältä joko diffuusiolla tai kantajamateriaalin hajoamisen myötä. Uusia käyttökohteita ovat mm. hopealla pinnoitetut sydämen tekoläpät, verisuoni- ja virtsatiekatetrit, joiden on kliinisissä kokeissa todettu vähentävän infektioita (Gosheger ym., 2004). Uusimpiin sovelluksiin kuuluvat myös nanopartikkelihopeaa sisältävät materiaalit, joista on saatu lupaavia tuloksia (Kuva 7) (Furno ym., 2004).



Kuva 7. Kuvassa 7(b) nähdään antimikrobista nanopartikkelihopeaa sisältävän silikonilevyn aiheuttama mikrobi vapaa alue (15 mm), joka on ympäröity ja osoitettu nuolella. Kuvassa 7(a) on silikonilevykontrolli, joka ei sisällä nanopartikkelihopeaa. Kuva on peräisin Furno ym., 2004 alkuperäisestä artikkelista.

Hopean antimikrobinen vaikutus perustuu pääosin ionimuodossa olevaan hopeaan (Ag^+), jonka on osoitettu inhihoivan tehokkaasti sekä Gram -positiivisten että Gram -negatiivisten bakteerien kasvua (Yeo & Jeong, 2003). Hopean antimikrobisen ominaisuuden on havaittu tehoavan myös yleisimpiin antibioottiresistentteihin bakteereihin, kuten metisilliiniresistenttiin *Staphylococcus aureukseen* (MRSA) ja vankomysiiniresistenttiin *Enterococcus* (VRE) ja moniin hiiva- ja homesieniin sekä viruksiin. (Juutilainen & Niemi, 2007.)

Hopealla on monia etuja perinteisiin antibiootteihin verrattuna. Hopean etuihin kuuluvat mm. kudosityhteensopivuus ja vähäinen toksisuus. Hopeaa voidaan pitää turvallisena, koska sille ei antibiooteista poiketen kehity resistenssiä. (Gosheger ym., 2004; Harges ym., 2007; Juutilainen & Niemi, 2007.) Hopean etuihin kuuluu myös tehokkuus, sillä hopea toimii pieninä pitoisuuksina, ja sen teho on pitkäkestoista. Antibiooteista poiketen, hopean on havaittu vähentävän myös bakteerien kolonisaatiota vierasesineen pinnalla ja siten estävän biofilmin muodostumista (Bosetti ym., 2002; Gosheger ym., 2004). Lisäksi hopea on antibiootteihin verrattuna optimaalisempi implanttisovelluksiin, koska se kestää myös gammasterilointia vastoin kuin antibiootit tai monet muut antimikrobiset aineet. Hopean heikkouksiin kuuluu puolestaan mahdollinen Argyrian vaara pitkäaikaisessa käytössä ja suurissa pitoisuuksissa (Gosheger ym., 2004; Papp ym., 2007). Tämä tarkoittaa vaaratonta, mutta kosmeettista ja epämiellyttävää ihon ja limakalvojen värjäytymistä harmaansinisiksi. Goshegerin ym. (2004) mukaan Argyria on implanttisovelluksissa epätodennäköinen, sillä systeeminen Argyriaa vaatii 4-6 g hopeaa ja esimerkiksi suuri reisiluuproteesi (350mm x 25mm, pinnoite 0.004 mm) sisältää vain 1,15 g hopeaa.

Hopea ionien antimikrobinen vaikutus perustuu siihen, että ne häiritsevät mikrobien elektroninsiirtoa ja hengitysketjua. Lisäksi hopea-ionien on todettu kiinnittyvän solukalvoihin, entsyymeihin ja nukleiinihappoihin sekä denaturoivan mikro-organismeille välttämättömiä proteiineja, jolloin esim. suojaavan soluseinän läpäisevyys kasvaa. (Gosheger ym., 2004.)

Hopean käytössä oleellista on oikea vapaan hopean (Ag^+ -ionien) pitoisuus ympäröivässä kudoksessa, sillä kantajamateriaalissa sitoutuneena oleva hopea ei ole aktiivista (Harges ym., 2007). Hopean pitoisuus pitää olla riittävä, jotta bakterisidinen

(bakteereita tappava) vaikutus saadaan aikaan. Liian alhaisella hopeapitoisuudella bakterisidisiä vaikutuksia ei saavuteta, vaan saadaan ainoastaan bakteriostaattinen eli bakteerien lisääntymistä estävä vaikutus. Täsmällistä hopeapitoisuutta, joka tarvitaan antimikrobisen vaikutuksen saamiseksi, on vaikea arvioida, koska se vaihtelee sovelluskohteittain (Hardes ym., 2007).

2.7 Bioyhteensopivuus

Implanttimateriaalien ehdoton edellytys on bioyhteensopivuus, koska ne ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa elimistön solujen ja kudosten kanssa. Bioyhteensopivuudella tarkoitetaan materiaalin yhteensopivuutta sekä kudoksen että veren kanssa. Bioyhteensopivuus edellyttää, että materiaali ei aiheuta laajaa kudოსvaurioita tai muita haitallisia reaktioita paikallisesti eikä systeemisesti (koko elimistöön vaikuttaen). Erityisesti materiaalin veriyhteensopivuus on tärkeää, sillä veren puolustusjärjestelmän vastareaktio on poikkeuksellisen raju ja äkillinen verrattuna muihin kudoksiin.

Implanttimateriaalit voidaan jakaa neljään ryhmään aiheuttamansa kudოსreaktion mukaan: toksiset, biologisesti lähes inertit, bioaktiiviset ja biohajoavat materiaalit (Kellomäki, 2000; Ellä, 2005). Jos implanttimateriaali tappaa soluja ympäröivästä kudoksesta ja aiheuttaa massiivisen tulehduksen, se on toksinen. Mikään materiaali ei voi olla täysin inertti elävässä kudoksessa, vaan elimistössä aiheutuu aina jonkinlainen kudოსvaste. Tästä syystä joidenkin materiaalien aiheuttamaa reaktiota kutsutaan biologisesti lähes inertiksi. Lähes inertti materiaali aiheuttaa elimistössä sidekudოსkapselin muodostumisen materiaalin ympärille. Sidekudოსkapselin muodostuminen on osa kehon vierasesinereaktiota, jota pidetään normaalina ja hyväksyttävänä niin kauan, kun se on suhteellisen lievä. Tällä tavoin elimistö pyrkii eristämään implantin muusta kudoksesta. Sidekudoksen paksuus vaihtelee implantaatti- ja kudostyypeittäin. Voidaan sanoa, että mitä ohuempi sidekudოსkapseli on, sitä kudოსyhteensopivampi materiaali on kyseessä. Bioaktiiviset materiaalit muodostavat kudoksen kanssa aktiivisen rajapinnan, jonka kautta materiaali ja kudოს ovat vuorovaikutuksissa toistensa kanssa. Biohajoava materiaali puolestaan absorboituu pois elimistöstä aineenvaihdunnan kautta. Tällöin ympäröivä kudოს korvaa implantin ajan myötä. Sama implanttimateriaali voi aiheuttaa joukon erillisiä reaktioita kehossa.

Näiden reaktioiden summa lopulta määrää mihin ryhmään materiaali luokitellaan. (Ellä, 2005.)

Bioyhteensopivuuden kannalta biomateriaalin inerttiyttä eli passiivisuutta pidetään ideaalisena ominaisuutena. Toisaalta, jos materiaali saadaan tarkoituksenmukaiseen vuorovaikutukseen kehon kanssa, voi sovellustapa olla passiivisuutta optimaalisempi. Joka tapauksessa kudousyhteensopivana biomateriaalina pidetään materiaalia, joka ei ärsytä, aiheuta allergiareaktioita tai toksisuutta.

Biomateriaalien kudusyhteensopivuus arvioidaan yksinkertaisimmillaan sen ympärille muodostuvan sidekuduskapselin laajuuden ja rajapinnalla esiintyvien tulehdus- sekä vierasesinejättisolujen määrän perusteella. Mitä pienempi on syntyvä sidekuduskapseli ja mitä vähemmän tulehdussoluja esiintyy, sitä parempi on materiaalin kudusyhteensopivuus. Näitä vierasesinereaktioon kuuluvia paikallisia muutoksia voidaan tarkastella histologisesti.

Biomateriaalien tutkimus- ja kehitystyö tähtää ennen kaikkea materiaalien biokompatibiliteetin parantamiseen. Tämä tarkoittaa pintaominaisuuksien kehittämistä tai materiaalin bioaktiivisuuden parantamista esim. seostamalla tai pinnoittamalla materiaali terapeuttisilla aineilla, kuten kasvutekijöillä tai lääkeaineilla. Tavoitteena on saada materiaali positiiviseen vuorovaikutukseen kehon kanssa.

2.7.1 Materiaalin ja kudoksen rajapinnalla tapahtuvat reaktiot

Tärkein materiaalin ja kudoksen vuorovaikutusalue on niiden väliin muodostuva rajapinta. Tämän rajapinnan välityksellä tapahtuvat reaktiot määräävät, onko kudostavaste positiivinen, negatiivinen vai neutraali materiaalia kohtaan. Myös materiaalista rajapinnalle vapautuvat yhdisteet, kuten esimerkiksi lääkeaineet, vaikuttavat kehon käynnistämään vasteeseen. (Ellä, 2005.)

Useat synteettisesti valmistetut implanttimateriaalit ovat kemiallisesti reagoimattomia. Tämä ei kuitenkaan tarkoita, että materiaalilla ei olisi vuorovaikutuksia veren, solujen ja kudosten kanssa. Kehon kannalta merkittävimpiä rajapinnalla tapahtuvia reaktioita ovat biomolekyylien reagointi materiaalin pintamolekyylien kanssa. Positiiviseen

rajapintareaktioon kuuluu erityisesti proteiinien adsorptio materiaalin pinnalle. Proteiinien johdolla biomolekyylit muodostavat jatkuvasti uudistuvan kasvualustan ympäristön soluille. Biomolekyyliä saavuttavat solut jakaantumaan ja muodostamaan haluttua kudosta, jolloin kudoksen parantuminen nopeutuu. Neutraaleihin rajapintareaktioihin kuuluu sidekuduskapselin muodostuminen materiaalin ympärille. Kudokselle tai materiaalille ei aiheudu tästä reaktiosta haittaa eikä hyötyä. Negatiivisiksi reaktioiksi katsotaan allergiat, nekroosi sekä krooniset vierasesinereaktiot. (Ellä, 2005.)

2.7.2 Biomateriaalien aiheuttamat kudostuotot

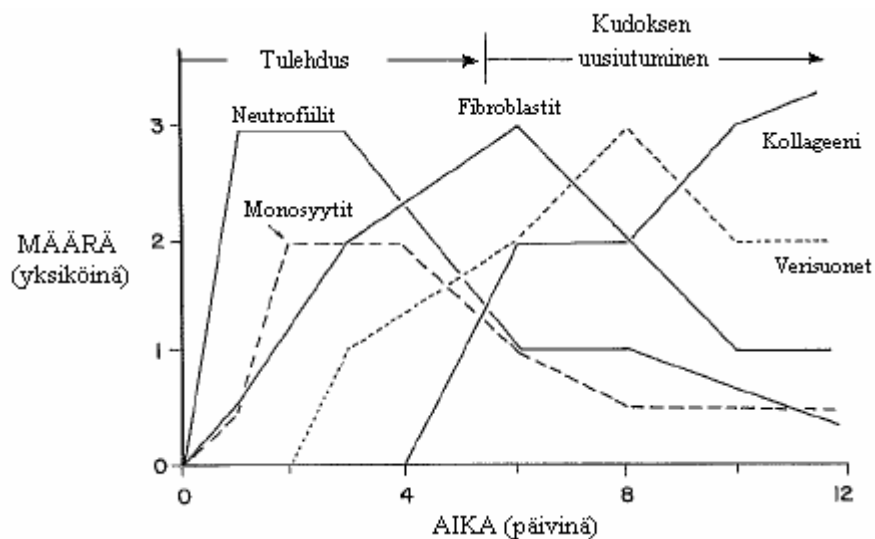
Bioyhteensopivuuden kannalta tärkeimpiä huomioitavia seikkoja ovat biomateriaaleista irtoavien partikkelien vaikutukset sekä paikallisesti että systeemisesti. Ajan myötä biomateriaaleissa tapahtuu kulumista, korroosiota ja väsymistä. Tämä johtaa partikkelien irtoamiseen materiaalista ja vierasesinereaktion syntyyn. Vierasesinereaktio on yksi kroonisen eli pitkittyneen tulehduksen muoto, jota vieras materiaali ja vapautuneet partikkelit ylläpitävät.

Vierasesinereaktioon kuuluvat opsonisaatio, kemotaksis, tulehdussolujen ja komplementin aktivaatio sekä fagosytoosi. Vierasesinereaktion tyypillisimpiä soluja ovat granulosityytit (neutrofiilit, basofiilit, eosinofiilit) sekä veren monosyyteistä peräisin olevat kudostuotot, joiden pääasiallisena tehtävänä on poistaa vierasesinereaktioita, bakteereja, kuolleita soluja sekä vaurioitunutta kudosta. Granulosyyttiset neutrofiilit ovat vallitseva solutyyppi tulehduksen alkuvaiheessa, heti kudostuotion jälkeen (Kuva 8). Pidempään kestäneessä kroonisessa vierasesinereaktiossa vallitsevana tulehdussolutyyppinä ovat puolestaan lymfosityytit, makrofagit ja jättisolut. (Dee ym., 2002.)

Normaalisti immuunipuolustuksen syöjäsoluista makrofagit ja monitumaiset jättisolut fagosytoivat kehoon joutuneet vierasesineet ja niistä irronneet partikkelit (Dee ym., 2002; Waris ym., 2004). Jättisolut ovat peräisin fuusioituneista makrofageista, jotka ovat kohdanneet suuren vierasesinereaktioita, jota yksittäinen makrofagi ei pysty fagosytoimaan. Vierasesinereaktioita hajoavat entsymaattisesti syöjäsolujen sisällä

happamissa fagosomeissa (Dee ym., 2002). Makrofagin kuollessa osa sen syömistä vierasesineistä vapautuu uudelleen soluväliaineeseen, josta ne päätyvät uusien paikalle saapuneiden makrofagien syötäviksi. Tämä jatkumo kasvaa ja paikalle saapuu yhä uusia syöjäsoluja kuolleiden tilalle. (Dee ym., 2002.) Tämä tarkoittaa jatkuvaa vierasesinereaktiota ja kroonista tulehdusta. Aktivoituneet makrofagit rekrytoivat myös muita immuunipuolustuksen soluja erilaisten sytokiineiksi kutsuttujen säätelytekijöiden kautta. Näiden sytokiinien houkuttelemana (ns. kemotaktisesti) paikalle saapuu lisää tulehdussoluja verenkierron kautta ja myös kudoksen omat latenttitilassa olevat solut alkavat uudelleen toimia. (Dee ym., 2002.)

Vierasesinereaktioon kuuluu tulehdussoluaktivaation lisäksi myös sidekudoksen muodostuminen. Jos solut eivät pysty kokonaan poistamaan vierasesinettä, niin kehon mahdollisuutena on eristää materiaali ympäristöstään. Tämä tapahtuu fibroblastien toimesta, jotka muodostavat vieraan materiaalin ympärille kollageenia sisältävän sidekudoskapselin (Kuva 8) (Waris ym., 2004).



Kuva 8. Pehmytkudosvaurion kaksi ensimmäistä viikkoa kaaviona. Tulehdussolut, kuten neutofiilit ja monosyytit, kiertävät verenkierrossa, kunnes ne löytävät tiensä kemotaktisesti vaurioituneeseen kudokseen. Niiden määrä on suurimmillaan kudოსvaurion ensimmäisenä viikkona. Kahden viikon kuluttua kudოსvauriosta sidekudoksen määrä on vaurioalueella lisääntynyt ja uudisverisuonten muodostuminen alkanut. Kuva on muokattu kirjan kuvasta *Biomaterials an introduction* s. 226 (Park & Lakes, 1992).

2.7.3 Polyestereiden kudosityhteensopivuus

Ensimmäisten polyglykolista (PGA) valmistettujen fiksaatiivälineiden yhteydessä todettiin hyvinkin voimakas tulehdusreaktio (1,8-25 %:ssa aikuistapauksista), joka ilmeni nesteenkertymisellä ja sinusmuodostuksena. Voimakkaan kudosityhteensopivuuden katsottiin johtuvan homopolymeerisen PGA:n hyvin nopeasta hajoamisesta. (Böstman & Pihlajamäki 2000.) Tämä materiaali onkin siirtynyt muiden kudosityhteensopivuudeltaan parempien implanttimateriaalien tieltä, mutta sitä käytetään yhä ommellankojen valmistuksessa juuri nopean hajoamisensa vuoksi. Poly-L-laktidin (P(L)LA) kudosityhteensopivuus on todettu hyväksi, mutta sekin voi aiheuttaa, tosin hyvin harvoin (0,2 %:lla) tulehdusreaktion, joka ilmenee pitkän liukenemisajan vuoksi 4-5 vuoden kuluttua. Tämän katsotaan johtuvan hydrolyysin kautta vapautuvista P(L)LA-kiteistä, jotka ovat hydrolyyttisesti stabiileja. (Böstman & Pihlajamäki 2000.) Nämä kiteet ylläpitävät jatkuvaa makrofagi aktivaatiota ja näin pitkittävät tulehdusreaktiota. Näistä syistä P(L)LA:n käyttö on vähentynyt nykyään yleisemmin käytettävien P(L/D)LA- ja PLGA-materiaalien tieltä, joiden kudosityhteensopivuus on hyvä vähäisen kiteisyyden ja tasaisen liukenemisen ansiosta (Ashammakhi ym., 2003).

3 Tutkielman tausta ja tavoitteet

Histola Research Oy:n, Scaffdex Oy:n ja Tampereen teknillisen yliopiston yhteistyönä käynnistyi syksyllä 2006 kirurgisen tyräleikkausverkon kehittämiseen ja markkinoille saattamiseen tähtäävä projekti. Projektin lähtöasetelmat laadittiin TTY:n ja Scaffdexin vahvan biomateriaalituntemuksen pohjalta. Histola osallistui projektiin tarjoamalla tutkimuspalvelut sekä histoteknologiset laitteistot ja menetelmät kudostavasteiden osoittamiseen. Tämä tutkielma laadittiin edellä mainitun projektin kuuden ensimmäisen kuukauden tulosten pohjalta.

Tutkielman lähtökohtana oli tuottaa prekliinisiä tutkimustuloksia, joiden perusteella kirurgiselle tyränkorjaustuotteelle löydettäisiin optimaalinen materiaaliyhdistelmä. Tämän tutkielman päätavoitteena oli selvittää gammasteriloidun biohajoavan polylaktidi-96L/4D-verkon bioyhteensopivuus ja turvallisuus elävässä kudoksessa. Tutkielman toisena tavoitteena oli selvittää antimikrobisen hopean vaikutuksia vierasesineen yhteydessä. Aiempien tutkimuksien perusteella varsinaiseksi tutkimuskohteeksi valittiin biohajoava verkkomateriaali, joka oli joko puhdasta poly-96L/4D-laktidia tai poly-96L/4D-laktidia, joka sisälsi 0,5 tai 2 paino- % antimikrobista hopeaa. Polypropeenia käytettiin tässä tutkimuksessa biohajoamattomana kontrollimateriaalina. Materiaalien bioyhteensopivuutta verrattiin toisiinsa sekä biohajoamattomaan kontrolliin. Mikäli hopealla oli havaittava vaikutus kudostavasteeseen, niin jatkotavoitteena oli antaa arvio siitä, kumpi pitoisuus 0,5 paino- % vai 2 paino- % lisättyä antimikrobista hopeaa on vaikutuksiltaan optimaalisempi. Tavoitteena oli myös seurata makroskooppisesti materiaalin hajoamista.

4 Materiaalit ja menetelmät

4.1 Koe-eläimet

Koe-eläimeksi valitsimme Sprague-Dawley urosrotan, koska se on kooltaan ja eliniältään sopiva tutkimuksemme läpivientiin. Jokaiseen näytteenottoryhmään (1 vko, 3 kk ja 6 kk) valitsimme kuusi rottaa, jotka olivat painoiltaan vähintään 350 g. Kontrollirottia, joita ei implantoitu, oli viisi yksilöä. Tutkimukssamme oli yhteensä 23 rottaa, joiden hyvinvointia seurattiin Tampereen yliopiston koe-eläintiloissa aina näytteenottoon saakka.

4.2 Implantoitujen materiaalit

Rotan selkäpuolelle, ihonalaiskudokseen eli subkutikseen implantoitiin neljä erilaista gammasteriloitua biomateriaalia. Näistä kolme oli varsinaisia biohajoavia tutkimuskohteita, joista kahteen oli lisätty antimikrobista hopeaa. Hopeayhdiste oli valmistuksen yhteydessä sekoitettu polymeerigranulaatin joukkoon. Neljäs materiaali oli ominaisuuksiltaan ja bioyhteensopivuudeltaan tunnettu polypropeeni kontrolli. Jokaisesta materiaalista oli valmistettu n. 1 x 1 cm:n kokoinen verkkorakenne.

Taulukko 2. *Tutkimuksen testimateriaalit*

1. biohajoava poly-96L/4D-laktidi + antimikrobista hopeaa 0,5 paino- %
2. biohajoava poly-96L/4D-laktidi + antimikrobista hopeaa 2 paino- %
3. biohajoava poly-96L/4D-laktidi
4. biohajoamaton polypropeeni

4.3 Implantointi

Ennen koetta eläimiä pidettiin dieetillä standardi laboratorio-olosuhteissa. Implantointia varten eläimet nukutettiin yleisanestesiaan käyttäen Domitor-Ketalar (1:3) -lääkeaineyhdistelmää. Lääkeaine injektoidiin intraperitoneaalisesti rotan painon mukaan (Domitor®, Pfizer, Espoo, Finland, 0.05 mg/100 g ja Ketalar®, Park Davis,

Caringbah, NSW, Australia, 7.5 mg/100 g). Nukutusaineen vaikutettua jokainen rotta korvatatuoitui myöhempää tunnistusta varten ja niiden turkki ajeltiin selkäpuolelta niskasta hännän tyveen asti. Tämän jälkeen selän nahka puhdistettiin 70 %:lla alkoholilla.

Jokaisen rotan selän subkutikseen eli ihonalaiskudokseen implantoitiin neljä eri biomateriaalia (Taulukko 2) n. 2 cm:n välein. Implantteja varten rotan steriloituun nahkaan leikattiin skalpellilla 1,5 cm leveät viillot. Implantit pujotettiin nahan alle pinsettien avulla. Viillot ommeltiin kiinni sulavalla ommelangalla. Materiaalit implantoitiin selkään sattumanvaraiseen järjestykseen, kuitenkin siten, että jokaisen implantin paikka oli tiedossa. Tällä tavoin minimoimme implantointikohdan vaikutukset tuloksiin. Implantoinnin jälkeen eläimet siirrettiin häkkiin toipumaan normaalidieetillä ja niille annettiin kipulääkitystä (L-Polamivet®) kahden vuorokauden ajan.

4.4 Seuranta

Kudosityhteensopivuutta seurattiin kolmessa aikapisteessä 1 viikon, 3 kuukauden ja 6 kuukauden kohdalla (Taulukko 3). Rottien terveydentilaa seurattiin päivittäin. Poikkeamat käyttäytymisessä, syömisessä tai juomisessa kirjattiin ylös. Lisäksi rottien painoa seurattiin punnituksin aluksi yhden ja myöhemmin kahden viikon välein.

Taulukko 3. *Näytteenottoryhmät ja seuranta-ajat*

<i>Ryhmä I:</i> kontrolliryhmä. Ei altistusta.
<i>Ryhmä II:</i> seuranta-aika 1 vko.
<i>Ryhmä III:</i> seuranta-aika 3 kk.
<i>Ryhmä IV:</i> seuranta-aika 6 kk.

Pro gradu -tutkielman tulokset laadittiin ryhmien I-IV osalta. Arvioiden mukaan suurimmat muutokset bioyhteensopivuudessa tapahtuu näiden seuranta-aikojen puitteissa. Projekti jatkuu kahden tutkielman ulkopuolisen 9 kuukauden ja 1 vuoden seurantaryhmien tarkastelulla. Nämä seuranta-ajat ovat tuloksellisesti merkittävämpiä biohajoavuuden kannalta.

4.5 Näytteenotto

Kustakin altistuskohdasta otettiin kudoksenäytteet taulukossa 3 mainituissa aikapisteissä. Nuketettujen rottien selistä otettiin kudoksenäytteet, jotka sisälsivät ihon kaikki kerrokset (epidermis, dermis ja subkutis) implantteineen. Tämän jälkeen kudoksenäytteet siirrettiin fiksoitumaan formaliiniin. Näytteenoton jälkeen eläimet lopetettiin asianmukaisesti hiilidioksidikaasulla.

4.6 Histologia

Kudoksenäytteitä fiksoitiin 10 %:ssa fosfaattipuskuroidussa formaliinissa kaksi viikkoa. Prosessointi suoritettiin nousevassa alkoholisarjassa ja ksyleenissä (70%-80%-95%-100%-Ksy-Ksy). Prosessoinnin jälkeen näytteet valettiin parafiiniblokeiksi, joista leikattiin 3 µm:n paksuisia poikkileikkeitä. Leikkeet siirrettiin näytelaseille ja värjättiin hematoksyliinillä ja eosiinilla.

4.7 Kudostyypin ja biohajoamisen makroskooppinen tarkastelu

Materiaalin aiheuttamaa kudostyypin ja biohajoamisen etenemistä tarkasteltiin makroskooppisesti näytteenoton yhteydessä. Tarkastelun kohteena oli materiaalin rakenne, kuten eheys ja pehmeys, sekä implantin ympärillä oleva kudos. Huomiot ja poikkeamat kirjattiin ylös.

4.8 Mikroskopiointi

4.8.1 Sokkoutus

Näytelasit sokkoutettiin eli numeroitiin sattumanvaraisesti 1-72, jolloin alkuperäinen materiaali ja aikapiste eivät olleet tiedossa mikroskooppista arviota tehdessä. Näin analysoinnista saatiin tiedostamaton arvio, eivätkä ennakkokäsitykset vaikuttaneet arvioon.

4.8.2 Mikroskooppiset parametrit ja pisteytys

Histologisesti materiaalin kudosityhteensopivuutta voi yksinkertaisimmillaan tutkia materiaalin ympärille syntyvän sidekuduskapselin laajuuden sekä tulehdussolujen määrän mukaan. Mitä ohuempi sidekuduskapseli ja mitä vähemmän tulehdussoluja, sitä kudosityhteensopivampi materiaali on. Ödeema on myös yksi tulehduksen merkeistä, jonka avulla voidaan tukea edellä mainituista parametreista saatuja tuloksia. Nämä parametrit ovat osa kudoksen vierasesinereaktioita ja siksi sopivia materiaalin kudosityhteensopivuuden havainnointiin.

Näyteleikkeistä arvioitiin kolme histologista parametria ödeema, tulehdusreaktio (eng. inflammation) ja sidekuduskapselin muodostuminen. Näitä muuttuvia parametreja verrattiin kontrollinäytteiden vastaaviin. Tulehdusreaktio pisteytettiin läsnäolevien tulehdussolujen likimääräisen lukumäärän mukaan. Ödeema ja sidekuduskapselin muodostuminen pisteytettiin niiden esiintyvyyden ja laajuuden mukaan. Näitä kolmea histologista parametria arvioitiin asteikolla 0 (ei muutoksia) – 4 (suurin mahdollinen poikkeavuus) 0,5 pisteen välein. Arvioinnissa käytetty asteikko laadittiin yhdistämällä ja muokkaamalla kahta pisteytysmetodia, joita oli käsitellyt Kronenthal ym., 1975 ja Niederau ym., 1986.

4.9 Tilastollinen analyysi

Tilastollinen analyysi tehtiin Spss-ohjelmalla. Tilastollista analyysiä varten materiaali- ja aikapisteryhmien koodaus aukaistiin. Materiaalit aikapisteineen jaettiin 12 ryhmään. Näiden ryhmien välisten erojen etsimiseen käytettiin Kruskal-Wallis-testiä. Nollahypoteesimme oli, että materiaalien ja eri aikapisteiden välillä ei ole eroja. P-arvot, jotka olivat alle 0.05 ($p \leq 0.05$) olivat tilastollisesti merkitseviä. Mikäli nollahypoteesi ($p \leq 0.05$) oli hylättävä, Mann-Whitney U-testiä käytettiin kahden eri ryhmän välisten erojen selvittämiseen.

5 Tulokset

5.1 Histologia

Histologisten parametrien erot testimateriaalien välillä olivat varsin pieniä. Suurimmat ja yleisimmät erot esiintyivät saman materiaalin eri aikapisteiden välillä. Yleisesti katsottuna, tilastollisesti merkitsevät muutokset vähenivät aikapisteiden myötä. Toisin sanoen, 3 kuukauden kohdalla tilastollisesti merkitseviä muutoksia oli vähemmän kuin 1 viikon kohdalla ja 6 kuukauden kohdalla merkitseviä muutoksia ei havaittu enää yhtään.

Histologiset pisteet implantointikohdan parametreista on esitetty kaavioissa 1-3. Kaavioiden arvot on esitetty mediaaneina. Implantoidut materiaalit on esitetty omina ryhminään ja seuranta-ajat on merkitty eri värein kunkin materiaalin kohdalla. Taulukoissa 1-3 on esitetty parametreissa esiintyvät tilastollisesti merkitsevät p-arvot.

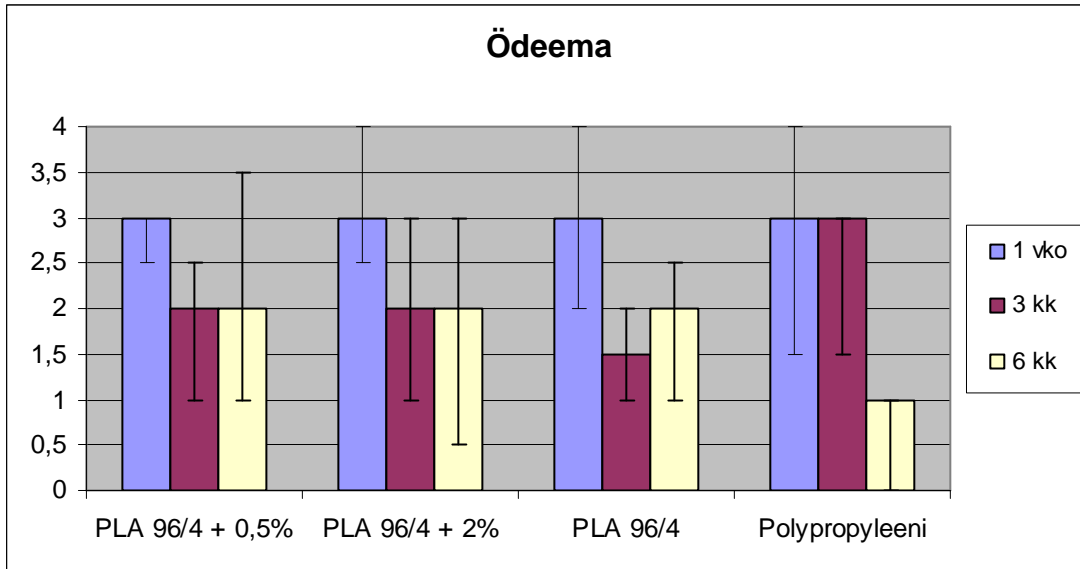
5.1.1 Ödeema

Ödeema-parametrissa löytyi tilastollisesti merkitseviä eroja materiaaliryhmien välillä 3 kuukauden aikapisteessä. Polypropeeni aiheutti enemmän ödeemaa 3 kuukauden aikapisteessä kuin muut, erityisesti verrattuna PLA (96L/4D):n ($p=0.020$).

Ödeema-parametrissa kaikkien materiaalien eri aikapisteiden väliltä löytyi tilastollisesti merkitseviä eroja. Lievin merkitsevyys esiintyi PLA (96L/4D) + 0,5 %:n aikapisteiden välillä ($p=0,053$) ja suurimmat merkitsevyudet PLA (96L/4D):n ($p=0,026$) ja polypropeenin ($p=0,025$) aikapisteiden välillä. Kaavion 1 mukaan ödeema väheni kaikilla materiaaleilla ensimmäisestä aikapisteestä viimeiseen. 1 viikon ja 3 kuukauden aikapisteiden välillä ödeeman väheneminen oli selkeää muilla paitsi polypropeenilla. Ödeema väheni myös polypropeenilla 6 kuukauden aikapisteeseen mennessä. Laajimmillaan ödeema oli 1 viikon seurannassa kaikilla neljällä materiaaleilla sekä polypropeenilla vielä 3 kuukauden aikapisteessä. Lievimmillään ödeema oli

polypropeenilla 6 kuukauden aikapisteessä. Suurin vaihtelu ödeeman arvoissa nähtiin siis polypropeenin kohdalla.

Kaavio 1. *Histologinen parametri ödeema. Tulokset on esitetty mediaaneina ja pisteiden vaihteluväli hakasilla.*



Taulukko 3. *SPSS tilasto-ohjelmalla lasketut ödeema-parametrin tilastollisesti merkitsevät p-arvot.*

<i>Materiaali ryhmien välillä 3 kuukauden aikapisteessä, $p=0.053$</i>
<i>Polypropeenin ja PLA (96L/4D):n 3 kuukauden aikapisteessä, $p=0.020$</i>
<i>PLA (96L/4D) + 0,5 %:n aikapisteiden välillä, $p=0.053$</i>
<i>PLA (96L/4D) + 2 %:n aikapisteiden välillä, $p=0.033$</i>
<i>PLA (96L/4D):n aikapisteiden välillä, $p=0.026$</i>
<i>Polypropeenin aikapisteiden välillä, $p=0.025$</i>

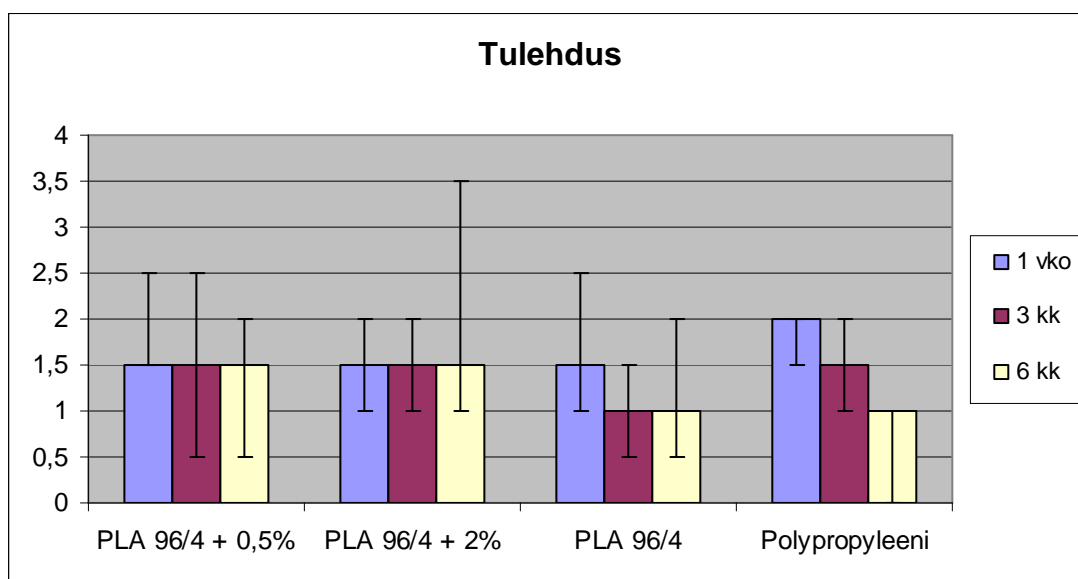
5.1.2 Tulehdus

Materiaalien aiheuttamaa tulehdusreaktiota (eng. inflammation) seurattiin läsnäolevien tulehdussolujen (lymfosyyttien, granulosityttien, makrofagien ja jättisolujen) määrän perusteella. Tulehdusreaktiomuutokset eri materiaalien välillä olivat varsin pieniä, eikä yhtään tilastollisesti merkitsevää eroa löytynyt materiaalien väliltä. Materiaalien aiheuttama tulehdusreaktio vaihteli lievästä (0-1,5) kohtalaiseen (1,5-2,5). Yleisesti katsottuna tulehdussolut olivat paikallistuneet materiaalien pintaan muodostaen ikään kuin tulehdussolukapselin materiaalien ympärille. Yksittäisiä

vierasesinejättisoluja oli havaittavissa kaikkien materiaalien pinnoilta. Nekroosista ei tehty havaintoja.

Tulehdusparametrin mukaan materiaalien ja aikapisteiden välillä ei juurikaan esiintynyt vaihtelua. Tulehdusreaktiomuutokset eri aikapisteiden välillä olivat tilastollisesti merkitseviä vain polypropeenilla ($p < 0.011$). Kaavion 2 mukaan tulehdusreaktio oli laajimmillaan polypropeenilla 1 viikon aikapisteessä ja minimissään polypropeenilla 6 kuukauden ja PLA (96L/4D):n 3 ja 6 kuukauden kohdalla. Selkein lasku tulehduksessa tapahtui siis polypropeenilla, kun taas PLA (96L/4D) + 0,5 %:n ja PLA (96L/4D) + 2 %:n kohdalla tulehdus säilyi seuranta-aikana muuttumattomana. Suurin vaihtelu aikapisteiden välillä eli selkein tulehduksen väheneminen ensimmäisestä aikapisteestä tapahtui polypropeenilla. Yhdelläkään materiaalilla tulehdusarvot eivät nousseet seuranta-ajan edetessä.

Kaavio 2. Histologinen parametri tulehdus. Tulokset on esitetty mediaaneina ja pisteiden vaihteluväli hakasilla.



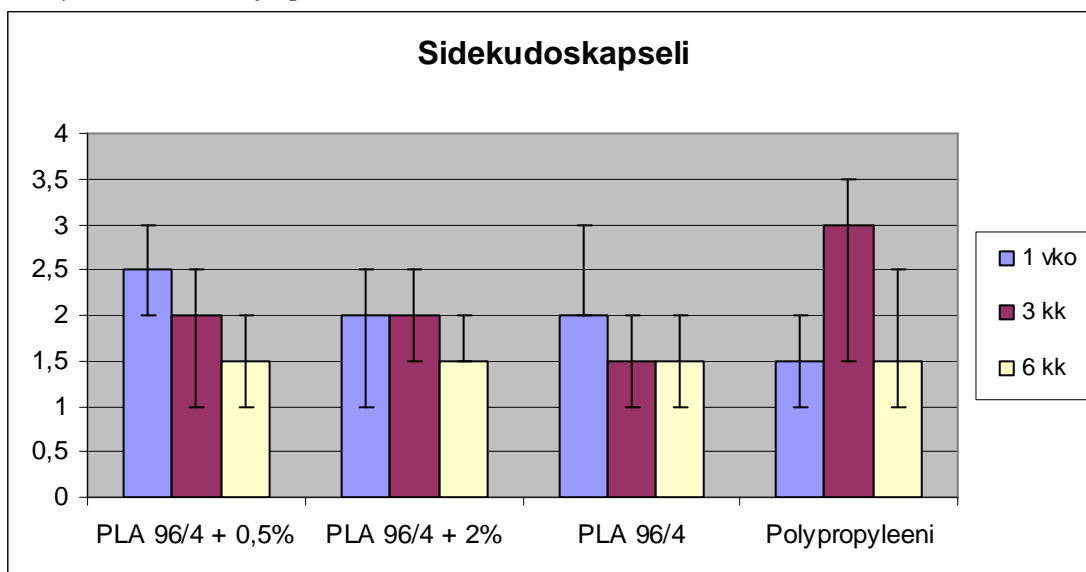
Taulukko 4. SPSS tilasto-ohjelmalla lasketut tulehdusparametrin tilastollisesti merkitsevät p-arvot.

Polypropeenin aikapisteiden välillä, $p < 0.01$

5.1.3 Sidekudoksen muodostuminen

Materiaalien väliltä löytyi tilastollisesti merkitsevä ero 1 viikon aikapisteessä ($p=0.020$). PLA (96L/4D) + 0,5 % ($p=0.009$) ja PLA (96L/4D) ($p=0.016$) aiheuttivat enemmän sidekudoksen muodostumista verrattuna polypropeeniin 1 viikon aikapisteen kohdalla. Kaavion 3 mukaan polypropeeni aiheuttaa enemmän sidekudoksen muodostumista 3 kuukauden aikapisteessä kuin muut. Tämä ero ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkitsevää vaihtelua Spss- ohjelman raaka-data analyysin mukaan. Myös materiaalien aikapisteiden väliltä löytyi tilastollisesti merkitsevää vaihtelua PLA (96L/4D):n ($p=0,007$) ja PLA 96/4 + 0,5 %:n ($p=0.022$) kohdalla. Molemmilla sidekudoksen muodostuminen väheni merkitsevästi seuranta-ajan myötä. Polypropeeni oli ainoa materiaali, jolla sidekudoksen muodostuminen lisääntyi alkutilanteesta, mutta se ehti myös laskea viimeiseen seurantapisteesseen mennessä.

Kaavio 3. Histologinen parametri sidekudoskapselin muodostuminen. Tulokset on esitetty mediaaneina ja pisteiden vaihteluväli hakasilla.



Taulukko 5. SPSS tilasto-ohjelmalla lasketut sidekudosparametrin tilastollisesti merkitsevät p-arvot.

Materiaaliryhmien välillä 1 viikon aikapisteessä, $p=0.020$

PLA (96L/4D) + 0,5 %:n ja polypropeenin välillä 1 viikon aikapisteessä, $p=0.009$

PLA (96L/4D):n ja polypropeenin välillä 1 viikon aikapisteessä, $p=0.016$

PLA (96L/4D):n aikapisteiden välillä, $p=0.007$

PLA 96/4 + 0,5 %:n aikapisteiden välillä, $p=0.022$

5.2 Antimikrobisen hopean vaikutukset kudokset

Tässä tutkimuksessa ei voitu osoittaa antimikrobisen hopean vaikutuksia kudokset. Odotuksena oli, että hopea vähentäisi ödeemaa, tulehdusreaktiota tai sidekudoksen muodostumista. Odotusten vastaisesti PLA 96/4 + 0,5 % aiheutti enemmän sidekudoksen muodostumista kuin polypropeeni 1 viikon aikapisteessä. Tämä havainto ei kuitenkaan ole tilastokelpoinen, sillä 1 viikko ei ole riittävä aika sidekudoksen muodostumiselle. Hopeaa sisältävien polylaktidien väliltä ei löytynyt tilastollisesti merkitsevää vaihtelua.

5.3 Materiaalien makroskooppinen tarkastelu

Polylaktidit eivät aiheuttaneet makroskooppisesti havaittavissa olevaa tulehdusta, eikä muita epänormaaleja kudokset muutoksia implantointikohtaan. Sen sijaan useissa implantointikohdissa oli nähtävissä valkoinen löyhä sidekudokset kertymä, joka osoittautui lähes poikkeuksetta polypropeenin aiheuttamaksi. Tämä makroskooppinen havainto tehtiin erityisesti 3 kuukauden aikapisteessä. Muissa aikapisteissä tämä havainto ei ollut yhtä yleinen.

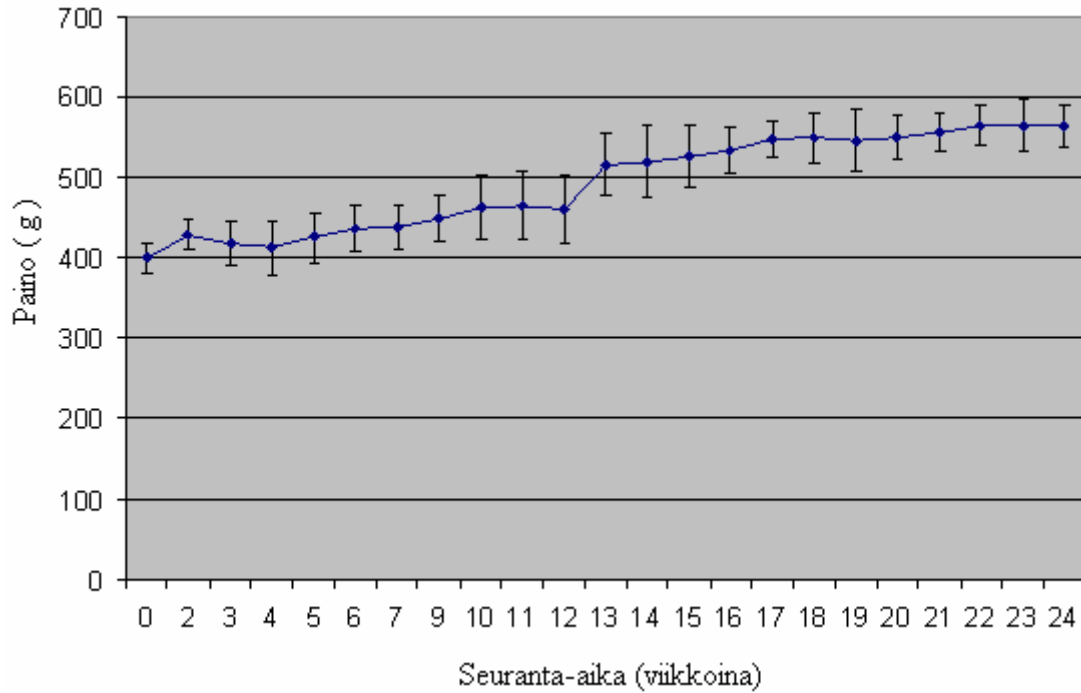
Yhden viikon ja 3 kuukauden aikapisteissä testimateriaaleista ei löytynyt biohajoamisen merkkejä. Hajoamista edeltävää polylaktidien pehmentymistä havaittiin 6 kuukauden aikapisteissä. Tämä kertoo materiaalin tukirangan osittaisesta pilkkoutumisesta ja siitä, että sidekudosta on kertynyt materiaalin ympärille. Polypropeenikontrollissa ei havaittu pehmentymistä.

5.4 Koe-eläinten terveyden seuranta ja painon kehitys

Yleisesti katsoen implantoidut rotat olivat leikkauksen jälkeisenä päivänä hieman rauhallisempia kontrollirottiin verrattuna. Fyysinen tila kohentui ja liike lisääntyi muutaman päivän kuluessa leikkauksesta. Implantoidut rotat söivät ja joivat kontrollirottien tapaan. Implantoitujen rottien paino lähti leikkauksen jälkeen nousuun ja painonkehitys oli yhtenevä kontrollirottien kanssa. Implantoitujen rottien paino nousi 6 kuukaudessa 400 g:sta n. 550 g:n (Kuva 8). Kuvassa 8 ei ole havaittavissa yleistä,

operoinnin jälkeistä painonlaskua, koska ensimmäinen punnitus suoritettiin 2 viikon kuluttua implantoinnista.

Kuva 8. *Implantoitujen rottien painon kehitys. Käyrä on piirretty painokeskiarvojen mukaan. Vaihteluväli on ilmoitettu hakasin.*



6 Pohdinta

Tässä tutkimuksessa testattiin kolmen biohajoavan (0, 0,5 ja 2 paino- % antimikrobista hopeaa sisältävän) polylaktidin kudosityhteensopivuutta ja biohajoavuutta rotan subkutiksessa. Polypropeeni toimi tämän tutkimuksen kontrollimateriaalina. Materiaalien kudosityhteensopivuutta tutkittiin vierasesineparametrien (ödeema, tulehdusreaktio ja sidekuduskapselin muodostuminen) avulla. Materiaalien biohajoamista ja kudosten muutoksia tarkasteltiin makroskooppisesti näytteenoton yhteydessä.

Tutkimustulosten perusteella jokaista testattua materiaalia voidaan pitää bioyhteensopivana ja turvallisena rotan subkutiksessa. Tätä päätelmää tukevat havainnot koe-eläinten terveydestä ja vireydestä sekä tulokset histologisista kudosten muutoksista, jotka vaihtelivat sallitusti lievästi kohtalaisiin.

Histologisten parametrien erot testimateriaalien välillä olivat varsin pieniä. Materiaalien väliset erot esiintyivät poikkeuksetta biohajoamattoman polypropeenikontrollin ja biohajoavan polylaktidin välillä. Polylaktidien keskinäistä vaihtelua ei havaittu minkään histologisen parametrin kohdalla. Suurimmat ja yleisimmät erot esiintyivät saman materiaalin eri aikapisteiden välillä. Yleisesti katsottuna polylaktidit aiheuttivat lievemmän ensireaktion kuin polypropeenikontrolli, mistä johtuen polypropeenilla nähtiin myös suurimmat vaihtelut eri aikapisteiden välillä. Huomion arvoista on, että histologisten parametrien erot vähenivät seuranta-ajan myötä eli tilastollisesti merkitsevää vaihtelua havaittiin enemmän 1 viikon seurannassa kuin 3 kuukauden seurannassa. Tämä trendi oli havaittavissa eritoten 6 kuukauden seurantapistessä, jossa tilastollisesti merkitseviä muutoksia ei havaittu enää yhdenkään histologisen parametrin kohdalla.

6.1 Histologiset parametrit (tulehdus, ödeema ja sidekudos)

Tulehdusparametrin tarkastelu antoi vähiten informaatiota materiaalien välisistä eroista. Merkitsevää vaihtelua löytyi vain polypropeenin aikapisteiden väliltä eli selkein tulehduksen väheneminen seuranta-ajan myötä tapahtui polypropeenilla. Tämä johtui siitä, että polypropeenin tulehduksellinen lähtöarvo oli muita suurempi. Polylaktidit

aiheuttivat lievemmän tulehduksellisen ensireaktion ja siksi tulehduksen väheneminen ei ollut yhtä selkeää kuin polypropeenilla. Kaikkien materiaalien tulehdussolumäärä laski seuranta-ajan myötä. Todennäköisesti tulehdusparametrissa olisi nähty selkeämpää vaihtelua materiaalien välillä, jos seurantapisteitä olisi ollut enemmän 1 viikon ja 3 kuukauden aikapisteiden välillä. Erityisesti 2 viikon seuranta-aika olisi varmasti antanut lisäinformaatiota siitä, minkä materiaalin kohdalla tulehdussolumäärä lähtee laskuun nopeimmin. Todennäköisesti myös antibakteerisen hopean vaikutukset tulehdussolujen määrään olisi ollut selkeämmin nähtävissä useampien seurantapisteiden myötä.

Ödeema-parametrin mukaan polypropeeni aiheutti enemmän nesteenkertymistä kudokseen kuin PLA (96L/4D) 3 kuukauden seurantapisteessä. Tämä tulos sopii yhteen myös 3 kuukauden seurantapisteiden makroskooppisen havainnon kanssa, jossa polypropeenin havaittiin aiheuttavan löyhän sidekudoksen muodostumista. Löyhä sidekudos sisältää runsaammin nestettä. Yleisesti katsoen ödeeman vähentyminen oli nopeampaa polylaktidien kohdalla, joten niiden voidaan katsoa olevan lievästi kudosityhteensopivampia materiaaleja polypropeeniin verrattuna.

Sidekudosparametrin mukaan polypropeeni aiheutti tilastollisesti vähemmän sidekudoksen muodostumista 1 viikon aikapisteessä kuin PLA (96L/4D) ja PLA (96L/4D) + 0,5 %. Tämä havainto voidaan kuitenkin sivuuttaa, sillä 1 viikko ei ole riittävä seuranta-aika sidekuduskapselin muodostumiselle. Polypropeeni oli ainoa materiaali, jolla sidekudoksen muodostuminen lisääntyi alkutilanteesta. Virhettä sidekudoksen arviointiin saattoi aiheuttaa se, että polypropeenin aiheuttama sidekudos havaittiin laaja-alaisemmaksi ja löyhemmäksi, eikä siten selkeärajaista sidekuduskapselia muodostunut. Tämä saattoi aiheuttaa todellista pienempiä arvioita ja siten vääristää tulosta. Polylaktidien muodostama sidekuduskapseli oli puolestaan useimmiten tarkkarajainen ja helposti pisteytettävissä. Lisähaasteen sidekuduskapselin arviointiin antoi se, että materiaalit oli sijoitettu subkutikseen eli ihon sidekudospohjaiseen kerrokseen. Mikäli sidekuduskapselin laajuutta halutaan tarkastella erittäin tarkasti, lihaskudos olisi varmasti optimaalisempi implantointipaikka. Subkutis on kuitenkin hyvin perinteinen kudosityhteensopivuustutkimuksissa käytetty implantointipaikka.

6.2 Antimikrobisen hopean vaikutukset kudosisreaktioon

Tässä tutkimuksessa ei voitu osoittaa, että hopea vähentäisi ödeemaa, tulehdusreaktiota tai sidekudoksen muodostumista. Koska hopean antimikrobisista ominaisuuksista on vahvaa näyttöä, saattoi hopean pitoisuus olla kudosisolosuhteisiin nähden liian vähäinen. Riittävää pitoisuutta on hyvin hankala määrittää mikrobiologisten viljelyiden pohjalta, sillä kudosisolosuhteet ovat varsin monimutkainen kokonaisuus bakteereiden soluviljelyolosuhteisiin verrattuna. Mahdollista on myös, että hopea toimii paremmin pinnoitteena kuin jakautuneena koko matriisin alueelle. Pinnoitteena hopea olisi vapautunut nopeammin kudosisympäristöön, mutta silloin pidempiaikaiset vaikutukset olisi menetetty. Toisaalta, hopea on voinut tässäkin tutkimusasettelussa vähentää leikkaushaavan mikrobeja, mutta sen vaikutus ei ole välittynyt riittävästi ödeeman ja sidekudosiskapselin laajuuteen eikä tulehdussolujen määrään. Lievä vaikutus on saattanut peittyä vierasesinereaktion alle. Antibakteerisen hopean vaikutukset olisivat saattaneet näkyä, jos seurantapisteitä olisi ollut enemmän 1 viikon ja 3 kuukauden seurantapisteiden välillä.

Koejärjestelymme ei ollut optimaalinen hopean antimikrobisen vaikutuksen tarkasteluun. Paras tapa tutkia hopean antimikrobisuutta olisi infektoida leikkaushaava tietyllä bakteerikannalla, seurata mikrobien määrää ja tutkia kudosisen parantumista. Tämän kaltaiseen koejärjestelyyn on kuitenkin hyvin vaikea saada koe-eläinlupaa, sillä se ei täytä eettisiä vaatimuksia. Tarkempaa hopean antimikrobista testausta voi suorittaa myös bakteeriviljelyllä, mutta se ei ole suoraan verrattavissa *In Vivo* -kokeisiin. Johtopäätös on, että hopean vaikutus pitäisi olla hyvin merkittävää, jotta sen vaikutus näkyisi monimutkaisessa kudosisvaurion korjautumisprosessissa. Koska hopean toimivuutta ei pystytty tässä tutkimuksessa osoittamaan, ei myöskään pystytty arvioimaan, kumpi pitoisuus 0,5 vai 2 paino-% antimikrobista hopeaa olisi optimaalisempi. Yleisesti katsoen PLA (96L/4D) + 0,5 % ja PLA (96L/4D) + 2 % käyttäytyivät hyvin samankaltaisesti kaikkien histologisten parametrien kohdalla.

6.3 Materiaalien makroskooppinen tarkastelu

Polylaktidit eivät aiheuttaneet makroskooppisesti havaittavissa olevaa tulehdusta, eikä muita epänormaaleja kudosuutoksia implantointikohtaan. Useissa implantointikohdissa oli kuitenkin nähtävissä valkoinen löyhä sidekuduskertymä, joka osoittautui lähes poikkeuksetta polypropeenin aiheuttamaksi. Tämä makroskooppinen havainto tehtiin erityisesti 3 kuukauden aikapisteessä. Sama havainto on tehty myös histologisesti ja se on nähtävissä kaaviossa 3 polypropeenin 3 kuukauden seuranta-ajan kohdalla. Näistä havainnoista huolimatta polypropeeni ei kuitenkaan aiheuttanut tilastollisen analyysin mukaan merkittävämpää sidekudoksen muodostumista kuin muut materiaalit 3 kuukauden aikapisteessä. Selkeää syytä tähän ei löytynyt.

Yhden viikon ja 3 kuukauden aikapisteissä testimateriaaleista ei löytynyt biohajoamisen merkkejä. Hajoamista edeltävää polylaktidien pehmentymistä havaittiin 6 kuukauden aikapisteessä. Materiaalin pehmentyminen on merkki mekaanisten ominaisuuksien vähentymisestä ja molekyyliirungon osittaisesta pilkkoutumisesta. Tämä oli odotettavaa, sillä puhtaan PLA (96L/4D):n on arvioitu säilyttävän mekaaniset ominaisuutensa 5-12 kuukautta (Waris ym., 2004). Gammasteriloinnin uskottiin nopeuttavan hieman materiaalien hajoamista, mutta silti pysyvän vaihteluvälin sisällä, sillä menetelmä on melko rankka polymeerirakenteille.

7 Johtopäätökset

Tutkimustulosten perusteella jokaista testattua materiaalia voidaan pitää kudosityhteensopivana ja turvallisena rotan subkutiksessa. Tätä päätelmää tukevat havainnot koe-eläinten terveydestä ja vireydestä sekä tulokset histologisista kudosuutoksista, jotka vaihtelivat sallitusti lievistä kohtalaisiin. Rotan subkutis soveltui hyvin biomateriaalien kudosityhteensopivuuden tarkasteluun, mutta tutkimusasetelma olisi kaivannut useampia seurantapisteitä materiaalikohtaisten erojen tarkentamiseksi. Tässä tutkimuksessa ei voitu osoittaa, että hopea vähentäisi ödeemaa, tulehdusreaktiota tai sidekudoksen muodostumista. Tutkimusasetelma ei ollut optimaalinen hopean antimikrobisen ominaisuuden tarkasteluun. Hopean *In Vivo*-tutkimusta jatkettaessa on syytä kiinnittää huomiota tutkimusasetelman lisäksi käytettävän hopean määrään ja sen sijaintiin materiaalissa, sillä hopean vaikutus pitäisi olla hyvin merkittävää, jotta sen vaikutus ei peittyisi vierasesinereaktion alle. Makroskooppisten havaintojen mukaan biohajoaminen oli käynnistynyt 6 kuukauden aikapisteeseen mennessä.

LÄHDELUETTELO

Alinovi A, Bassisi P, Pini M. Systemic administration of antibiotics in the management of venous ulcers. A randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 1986;15:186-91.

An Y, Woolf S, Friedman R. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials* 2000;21:2635-52.

Arshady R. Introduction to Polymeric Biomaterials, Volume 1, Citus Books, London, 2003, s. 354.

Ashammakhi N, Suuronen R, Tiainen J, Törmälä P, Waris T. Spotlight on naturally absorbable osteofixation devices. *J. Craniofac Surg* 2003;14:247-59.

Ballard B, Nelson E. *J Pharm Sci* 1962;15:915.

Bosetti M, Massé A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 2002;23:887-92.

Brannon-Peppas L. Polymers in controlled drug delivery. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine* 1997;34. [www-dokumentti] (luettu 01.03.2008)
<<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>>

Böstman O, Pihlajamäki H. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop* 2000;371:216-27.

Dee K, Puleo D, Bizios R. An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions, Wiley-Liss, New Jersey, 2002, s. 9, 92-99.

Ellä V. Vuorovaikutukset kehon kanssa. Johdanto biomateriaaleihin -luentomoniste, Tampereen Teknillinen yliopisto, 2005.

Furno F, Morley K, Wong B, Sharp B, Arnold P, Howdle S, Bayston R, Brown P, Winship P, Reid H. Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004;54:1019-24.

Gosheger G, Hardes J, Ahrens H, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Kemper F, Winkelmann W, von Eiff C. Silver-coated megaendoprosthesis in rabbit model -an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 2004;25:5547-56.

Hardes J, Ahrens H, Gebert C, Streitburger A, Buerger H, Erren M, Gonsel A, Wedemeyer C, Saxler G, Winkelmann W, Gosheger G. Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprosthesis in humans. *Biomaterials* 2007;28:2869-75.

Haukipuro K. Leikkausalueen infektiot. *Duodecim* 1996;112(10):904.

Jukarainen H, Strömberg C. Lääkeimplantaatit – teknologia lääkehoidon palveluksessa. *Duodecim* 2004;120:2008-14.

Juutilainen V, Niemi T. Uusia ajatuksia ja välineitä haavan hoitoon. *Duodecim* 2007;123:979-85.

Kellomäki M. 2000. Bioabsorbable and Bioactive Polymers and Composites for Tissue Engineering Applications. Doctor's Thesis. 246 s. Tampere University of Technology Publications 311. Tampere University of Technology, Tampere, Finland.

Kronenthal R, Oser Z, Martin E. Polymer science and technology, Volume 8, Polymers in medicine and surgery. Plenum Press, New York, 1975, s.120-121, 192.

Kulkarni R, Moore E, Hegyeli A, Leonard F. Biodegradable poly (lactid acid) polymers. *Journal of Biomedical Materials Research* 1971;5:169-81.

Kulkarni R, Pani K, Neuman C, Leonard F. Polyglycolic acid for surgical implants. *Archives of Surgery* 1966;93:839-43.

Laukkanen A, 2007, Helsingin yliopisto, Polymeerit biomateriaaleina -luentomateriaali. [www-dokumentti] (luettu 27.04.2008)
<http://www.helsinki.fi/farmasia/biofarmasia/Polymeerit_biomateriaaleina.pdf>

Li S, McCarthy S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly (DL-lactide). *Biomaterials* 1999;20:35-44.

Li S, Tenon M, Garreau H, Braud C, Vert M. Enzymatic degradation of stereocopolymers derived from L-, DL- and meso-lactides. *Polymer Degradation and Stability* 2000;67:85-90.

Middleton J, Tipton A. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. *Medical Plastics and Biomaterials Magazine* 1998; [www-dokumentti] (luettu 03.03.2008)
<<http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>>

Niederau C, Liddle R, Ferrell L, Grendell J. Beneficial effects of cholecystokinin-receptor blockade and inhibition of proteolytic enzyme activity in experimental acute hemorrhagic pancreatitis in mice. *J. Clin. Invest* 1986;78:1056-63.

Niiranen H. Hajoamisprosessit ja niihin vaikuttavat tekijät. Lääketieteellisten biomateriaalien perusteet – kurssin luentomoniste, Tampereen Teknillinen yliopisto, 2005.

Papp A, Koljonen V, Vuola J. Vaikeiden palovammojen hoito. *Duodecim* 2007;123:953-9.

Park J, Lakes S. Biomaterials an introduction, Plenum Press, New York, 2. painos, 1992, s. 226.

Repo H. Vierasesineinfektiot. *Duodecim* 1986;102:716-23.

Ritsilä V. Ortopediset infektiot. Duodecim 1991;107:577-82.

Seppälä J, Vallittu P, Närhi T, Aho A, Yli-Urpo A. Uudet polymeeripohjaiset biomateriaalit. Duodecim 2004;120:1203-9.

Törmälä P, Kellomäki M, Ashammakhi N, Suuronen R. Kullasta kudosteknologiaan – kohti optimaalista korjausta. Duodecim 2004;120:1975-6.

Waris E, Ashammakhi N, Waris V, Serlo W, Suuronen R, Törmälä P, Konttinen Y, Santavirta S. Biohajoavien kiinnittimien käyttö luukirurgiassa. Duodecim 2004;120:673-81.

Yeo S, Jeong S. Preparation and characterization of polypropylene/silver nanocomposite fibers. Polymer International 2003;52:1053-57.