

# **Pyogén csontfertőzések célzott, lokális antibiotikus terápiájának lehetősége polymethylmetacrylat kapszulák közvetítésével.**

PhD értekezés tézisei

Dr. Börzsei László Zoltán

Doktori iskola vezetője: Prof. Nagy Judit M.D., PhD., D.Sc.  
Programvezető: Prof. Róth Erzsébet M.D., PhD., D.Sc.  
Témavezető: Prof. Nyárády József M.D., PhD.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2006.

# **Pyogén csontfertőzések célzott, lokális antibiotikus terápiájának lehetősége polymethylmetacrylat kapszulák közvetítésével.**

PhD értekezés tézisei

Dr. Börzsei László Zoltán

Doktori iskola vezetője: Prof. Nagy Judit M.D., PhD., D.Sc.  
Programvezető: Prof. Róth Erzsébet M.D., PhD., D.Sc.  
Témavezető: Prof. Nyárády József M.D., PhD.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2006.

## Bevezetés

A motorizáció elterjedésével gyakorivá váltak a nagyenergiájú sérülések és nőtt a számaránya a súlyos légyszöveti, ízületi és csontsérüléseknek. A létrejövő szövetkárosodás elősegíti a baktériumok megtapadását, elszaporodását és invázióját. A fertőzések jelentős része a mikroorganizmusok sikeres multiplikációját jelenti a szervezetben. Fertőzés akkor alakul ki, ha egy baktérium képes elegendő számban megsokszorozni önmagát, mielőtt a szervezet eltávolítaná. Traumatológiai ellátások során gyakran találkozunk szeptikus folyamatokkal. A pyogen csontfertőzések manapság is nagy kihívást jelentenek az ellátó sebész számára. Napjainkban az exogén osteitis, osteomyelitisek száma szaporodik. A kórokozók részben a környező lágyrészek gennyes folyamataiból, részben sérülések, nyílt törések, csonton végzett műtéti beavatkozások során fertőzik meg a csontot. Zárt törések osteosynthesisei után 1 – 3%-ban, nyílt törések után 8 – 10%-ban fordul elő osteomyelitis. Exogén, purulens osteitis jöhet létre komplikált törés, lövés, szilánk sérülés okozta törés, osteosynthesisek, amputációk, csonttranszplantáció után. A fertőzés a csontra per-continuitatem terjed át, érinti a csontvelőt, a periosteumot, és a csont compact állományát is. A devitalizált csontdarabokból, szabad szilánkokból kialakult necroticus részek jó táptalajt biztosítanak a kórokozók számára. A chronicus osteomyelitisek kezelésében meghatározó az ép szövetig hatoló, kiterjesztett sebészi debridement és a hosszantartó, célzott parenterális antibiotikus terápia mellett, a lokális baktericid szintet biztosító antibiotikumot tartalmazó implantátum is.

A traumatológiai gyakorlatban néhány évtizede újdonságként jelent meg a lokális antibiotikus védelem lehetősége, melynek gyakorlata főként tapasztalati elveken nyugszik. Az antibiotikus öblítések kapcsán az öblítő folyadék mechanikus szerepén túlmenően, a mosófolyadékból az antibiotikumok, a szövetek, implantátumok felszínén elhelyezkedő baktériumokat is képesek elölni.

A védekezés ezen formájában szelektálni szükséges az antibiotikumok között. Az antibiotikumnak vízdékonynak és hőstabilnak kell lennie, hogy kibírja a csontcement polimerizációjakor felszabaduló hőt, mely akár a 100 C<sup>o</sup>-ot is meghaladhatja. Az antibiotikum nem befolyásolhatja a csontcement mechanikai tulajdonságait, és hozzáférhetőnek kell lennie por formájában. Ezen kritériumok alapján csak néhány antibiotikum jöhet szóba. Eddigi ismereteink szerint a használatos antibiotikum a gentamicin, az oxacillin és a cefuroxim. Európán kívül, főleg Észak-Amerikában használatos a tobramicin, a vancomycin, illetve a clindamycin, az eritromicin, valamint cefalosporinok: cefazolin, cefotaxim, cefamandol.

## Vizsgálataink célja

A septicus sebészetben, traumatológiában és ortopédiában használatos antibiotikum hordozó a PMMA. A csontsebészetben csontcementként használt anyag egyik fontos felhasználási területe a chronicus osteomyelitisek, a septicus ízületi és csont gennyedések terápiájában van. Mint lokális antibiotikum hordozó, a kereskedelmi forgalomban is kapható Gentamicin golyólánc vagy antibiotikum tartalmú spacer formájában. Localis antibiotikus kezelésre hőstabil, vízdékony és por formában hozzáférhető antibiotikumok alkalmazhatók, mert a PMMA polimerizációja során igen magas hő szabadul fel (80-100 °C), mely károsítja az antibiotikum szerkezetét. Ilyen tulajdonságokkal csak néhány antibiotikum rendelkezik, így nagyon beszűkül a célzottan lokálisan adható antibiotikumok köre. Ha a polimerizáció már lezajlott, akkor megszűnik a hőhatás, így gyakorlatilag bármely antibiotikum elhelyezhető egy PMMA-ból készült hordozó edényben (kapszulában), ha az antibiotikum annak falán penetrálni képes. Az előre legyártott és sterilizált kapszulákban ismert mennyiségű, az antibiogram alapján célzottan adható antibiotikum. A kiválasztott antibiotikum steril kapszulákba való töltése a műtét előtt, de akár a műtét közben is elvégezhető. Ezzel a módszerrel lényegesen kitágul a lokálisan adható antibiotikumok köre.

1. Célunk egy antibiotikum hordozó PMMA-ból készült edény kialakítása, melybe tetszés szerinti antibiotikum elhelyezhető és képes hosszú idejű terápiás koncentrációt biztosítani az infect területen.
2. Vizsgáljuk, hogy az antibiotikum képes-e áthatolni különböző vastagságú PMMA falakon.
3. Választ keresünk arra a kérdésre, hogy milyen összefüggés van a PMMA lapok vastagsága és az áthatoló antibiotikum mennyisége közt az idő függvényében.
4. Megtervezzük a legalkalmasabb és legegyszerűbben előállítható edényformát, mely a célnak megfelelhet.
5. Vizsgáljuk különböző antibiotikumok penetrációját különböző falvastagságú edényekből az idő függvényében.
6. Összehasonlító vizsgálatokat végzünk, azonos mennyiségű antibiotikumokat tartalmazó polymethylmethacrylatból készült gyöngyök és kapszulák antibiotikum kiáramlása között.
7. In vivo vizsgálataink során bizonyítani kívánjuk, hogy a kísérletesen létrehozott, radiológiailag és bakteriológiailag igazolt osteomyelitis modell esetén, terápiás hatást értünk el az általunk kifejlesztett PMMA antibiotikumot hordozó edény segítségével.
8. Szükségesnek tartjuk vizsgálni az állatkísérletek során a terápiás szakaszban lokálisan adott antibiotikum szisztémás keringésbe való jutását.

Az alábbiakban a módszereket és eredményeinket az értekezésben szereplő fejezetek tagolásában ismertetem.

## Anyagok és módszerek I.

### Polymethylmetacrylat (PMMA) cementlapok készítése

Különböző vastagságú cementlapokat készítettünk, melyhez Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone Cement-et (Howmedica, Rutherford, U.K.) használtunk. Az ismert csontcement sugárfogó anyagot is tartalmazó két steril komponensből áll, a gyógyászatban már hosszú ideje használatos. A két komponens összekeverését követően képlékeny állapotban helyeztük el a cementmasszát két, egymástól ismert távolságú tárgylemez közé. Ezt úgy készítettük, hogy egy tárgylemezre két oszlopban 0,1 mm vastagságú fedőlemezeket helyeztünk, majd a csontcement behelyezése után egy másik tárgylemezzel zártuk. Száradás után az üveglapokat lepattintottuk a csontcement lapocskákról. Ezen módszerrel 0,2 mm-től 0,8 mm vastagságig gyártottunk csontcement lapokat. A lapokat apró kádak középső válaszfalaként szilikonba ágyazva helyeztük el. Előzőleg fiziológiás oldattal meggyőződünk a falak vízzáróságáról. Az edényeket gázsterilizálással csíramentesítettük

### Clindamycin penetrációjának vizsgálata PMMA falon keresztül

Két kísérletsorozatot végeztünk. Az elsőnél a kád egyik felét 2 ml 200 µg/ml koncentrációjú clindamycin oldattal, a kád másik felét 2 ml fiziológiás konyhasóoldattal töltöttük fel. A másiknál 300 µg/ml koncentrációjú clindamycin oldatot használtunk. Mikrobiológiai vizsgáló módszerrel standard körülmények között figyeltük meg az antibiotikum megjelenését és koncentrációjának változását a fiziológiás sóoldatot tartalmazó kádban, vagyis a különböző vastagságú csontcement lapokon történő penetrációját az idő függvényében.

Óránként 3MM szűrőpapírból (Macherey-Nagel Limited, U.K.) vágott 6 mm átmérőjű korongokkal mintát vettünk a sóoldatból.

### Antibiotikum átáramlásának vizsgálata mikrobiológiai módszerrel

A fiziológiás sóoldatból vett korongokat Mueller-Hinton agaron (OXOID Limited U.K.) tenyésztett *Micrococcus luteus* ATCC 9341-es tesztörzsszel vizsgáltuk, 24 óras 37 °C-on történő inkubálás után olvastuk le a gátlási zónákat. A sóoldatok antibiotikum tartalmának kvalitatív jelzője a gátlási zóna jelenléte, kvantitatív mutatója a gátlási zóna szélessége

volt. A méréseket tolómérővel végeztük. A gátlási zónák mm-ben mért adatait standard hígítási sor alapján  $\mu\text{g/ml}$  antibiotikum koncentrációkra számoltuk át.

## Eredmények I.

Megállapítottuk, hogy a clindamycin ilyen koncentrációk mellett 4-5 nap múlva jut át kimutatható mennyiségben a PMMA lapokon, mind a 200, mind a 300  $\mu\text{g/ml}$  antibiotikum koncentráció esetében.

## Anyagok és módszerek II.

PMMA kapszulák gyártására alkalmas présgép tervezése, kivitelezése és különböző falvastagságú, de azonos méretű kapszulák készítése  
A kapszulákat magunk által tervezett és kivitelezett, bakelitből és alumíniumból álló présgéppel készítettük. Azonos nagyságú, de különböző falvastagságú edényeket gyártottunk, melyek 15 mm magas, 6 mm átmérőjű, 0.3-0.6 mm falvastagságúak, és 0.44 ml űrtartalmúak voltak. A gyártás során vízőldékony formaleválasztó oldatot használtunk. Ennek a kapszulákról történő eltávolítása után gázban sterilizáltuk és rugalmas szilikon rúdból készített dugókkal zártuk.

Különböző antibiotikumok kiáramlásának vizsgálata PMMA kapszulákból  
A steril kapszulákat aszeptikus körülmények között 100  $\mu\text{l}$  különböző antibiotikumot tartalmazó oldattal töltöttük fel:

- a. clindamycin 15 és 22.5 mg (Pharmacia & Upjohn, N. U/S. A. PUURS, Belgium)
- b. amoxicillin-clavulánsav 112.5 mg (Richter-Gedeon Rt., Hungary)
- c. amikacin 25 mg (Bristol-Mayers Squibb, Italy)
- d. cefotaxim 112.5 mg (Pfizer, Italy)

Vérszállító csőben lévő 1-1 ml fiziológiás NaCl oldatba helyeztük a lezárt, steril antibiotikummal telt kapszulákat. A kapszulákból kidiffundáló antibiotikumot a fent leírt, ismert, standard mikrobiológiai vizsgálmódszerrel mértük. Minden mérést háromszor végeztünk el, az eredményeket átlagoltuk, a standard hibát is feltüntettük a grafikonokon.

## Eredmények II.

### **A clindamycin penetrációja különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:**

A kapszulákkal végzett vizsgálatoknál az antibiotikum felszabadulását az 5. naptól kezdve detektáltuk. A gátlási zónák szélessége az idő előrehaladtával mindkét koncentráció (15 mg/100 µl, 22.5 mg/100 µl) esetében a falvastagságtól függetlenül növekedett, de vékonyabb falvastagság esetén (0.4 mm) a növekedés mértéke kisebb, mint a nagyobb falvastagságú kapszulák (0.5-0.6 mm) esetén.

### **Amoxicillin-clavulánsav penetrációja különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:**

A vékony falú (0.3-0.4-0.5 mm) kapszulákból az antibiotikum felszabadulást a harmadik naptól észleltük. Állandó, de kis átmérőjű gátlási zónák voltak megfigyelhetők a 17-29. napig. A 0.4 mm-es falvastagságú kapszulákból a diffúzió a 29. napig tartott.

### **A cefotaxim kiáramlása különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:**

A cefotaxim felszabadulás minden esetben már az első naptól mérhető volt. Vékony (0.3 mm) falvastagság esetén tartósan magas antibiotikum diffúziót figyeltünk meg 38 napon keresztül, a gátlási zónák 30-40 mm átmérőjűek voltak. Vastagabb falú kapszulák esetében a penetráció kisebb mértékűnek bizonyult és 15-21 napig zajlott.

### **Amikacin kiáramlása PMMA falon keresztül:**

Minden falvastagság esetén a harmadik napot követően 5 mm-t meghaladó gátlási zónákat mértünk. Mindez tartósan fennállt a 40 napos vizsgálati periódus alatt mindhárom falvastagság esetében. A 0,5 mm falvastagságú kapszulákból felszabaduló antibiotikum vizsgálata során 30-40 mm átmérőjű gátlási zónákat mértünk.

## Anyagok és módszerek III.

PMMA-ból készült antibiotikum hordozó kapszulák és gyöngyök összehasonlító vizsgálata

### **Azonos térfogatú és falvastagságú kapszulák készítése és különböző antibiotikumokkal való töltése**

A PMMA-ból készített vivőedény falán az antibiotikumok képesek átáramolni. Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone cementből (Howmedica Rutherford UK) kapszulákat állítottunk elő az általunk tervezett és kivitelezett présgép segítségével, mely bakelitből és alumíniumból készült. A kapszulák azonos nagyságúak, 15 mm magasak, 6 mm átmérőjűek, 0.3 mm falvastagságúak (0.44 ml űrtartalmú) voltak. A gyártás során vízdékony és

zsiroldékony formaleválasztó oldatokat használtunk. Ezek eltávolítása után a kapszulákat sterilizáltuk és szilikon rúdból készült dugóval zártuk. Csoportonként 6-6, összesen 36 kapszulába steril körülmények között 2 ml-es fecskendővel 23 G-s tűvel az alábbi antibiotikumok valamelyikét töltöttük. A szám adatok az egy kapszulába töltött antibiotikum mennyiségét mutatják 0.4 ml térfogatban:

- a. amikacin (0.1 g)
- b. clindamycin (0.06 g)
- c. piperacillin+tazobactam (0.08 g)
- d. amoxicillin+clavulansav (0.02 g)
- e. cefotaxim (0.1 g)

#### Különböző antibiotikumokat tartalmazó gyöngyök készítése

Ismert mennyiségű csontcementhez (5 g por, 2 ml oldószer) ismert mennyiségű antibiotikumokat kevertünk steril körülmények között, ezekből 6-6, összesen 36 db, átlagosan 12 mm átmérőjű és 1 g átlagos tömegű gyöngyöt készítettünk. A kapszulák és a gyöngyök töltését steril körülmények között végeztük.

A gyöngyök alapanyaga Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone cement volt (5 g por és 2 ml oldószer; Howmedica, Rutherford, UK), melyhez a megszilárdulás előtt steril körülmények között az alábbi antibiotikumok valamelyikét kevertük és 6 db gyöngyöt készítettünk belőle. Az alábbi szám adatok a gyöngyök átlagos átmérőjét és tömegét mutatják  $\pm$ s.e.m.

- a. amikacin (0.6 g; Amikin, Bristol Myers Squibb, USA): 12.25 $\pm$ 0.28 mm átmérőjű és 1.17 $\pm$ 0.06 g tömegű gyöngyök
- b. clindamycin (0.36 g; Dalacin, Pharmacia & Upjohn N U/S. A. PUURS, Belgium): 13.0 $\pm$ 0.37 mm átmérőjű és 1.27 $\pm$ 0.07 g tömegű gyöngyök
- c. piperacillin+tazobactam (0.5 g; Tazocin, Wyeth, ): 12.33 $\pm$ 0.21 mm átmérőjű és 0.98 $\pm$ 0.15 g tömegű gyöngyök
- d. amoxicillin+clavulansav (0.14 g; Augmentin, SmithKline Beecham UK): 12.33 $\pm$ 0.24 mm átmérőjű és 1.11 $\pm$ 0.09 g tömegű gyöngyök
- e. cefotaxim (0.57 g; Claforan, Human Hungary): 12.25 $\pm$ 0.16 mm átmérőjű és 1.18 $\pm$ 0.07 g tömegű



A lezárt, steril, antibiotikumokat tartalmazó kapszulákat és gyöngyöket külön-külön 2 ml fiziológiás NaCl oldatot tartalmazó edényekbe helyeztük.

## Eredmények III.

### **Amikacin kiáramlás**

Az amikacin mártogatásos módszerrel mért eredményei során a kapszulák esetében magas (850 µg/ml) értékeket mértünk a 15. napig, ezt követően a vizsgálat befejezéséig, a 31. napig az érték egyenletesen 150-180 µg/ml-es koncentrációra állt be. A kapszuláknál a gyógyszerleadás dinamikáját vizsgálva azt kaptuk, hogy az 1. napon az antibiotikum 56 %-át adta le, majd a 9. napig folyamatosan egyenletes leadás történt, ezt követően nem volt mérhető antibiotikum leadás. A gyöngyök vizsgálatakor az 1. naptól a 31. napig közel egyenletes, 200-300 µg/ml-es értékeket mértünk, míg a leadás dinamikáját vizsgálva az 1. naptól a 8. napig egyenletesen csökkenő értékeket kaptunk. A MIC érték *Micrococcus luteus*-ra vonatkoztatva 0,1 µg/ml.

### **Clindamycin kiáramlás**

A clindamycin a vizsgálat teljes ideje alatt igen magas, 2000-5000 µg/ml-es antibiotikum leadást detektáltunk a kapszulák esetében, amely valószínűleg tovább is folytatódott volna. A leöntéses módszerrel azt tapasztaltuk, hogy az 1. napon meghaladta a leadás az 53 %-ot. A gyöngyöknél alacsony, 100-500 µg/ml-es értékeket detektáltunk a 17. napig. A dinamikára vonatkozóan az 1. nap a teljes antibiotikum tartalom 12 %-át adta le, majd egyenletesen csökkenő értékeket mértünk a 15. napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

### **Piperacillin+tazobactam kiáramlás**

A piperacillin+tazobactam tartalmú kapszulák vizsgálatakor a 15. napig egyenletesen emelkedő koncentrációkat mértünk 1200 µg/ml-es értékig, majd meredek csökkenés után a 22. naptól nem volt detektálható antibiotikum leadás. A dinamikáját tekintve 3 nap alatt a teljes érték 69 %-át adta le, majd a 12. napig egyenletes értékeket mértünk. A gyöngyöknél igen alacsony antibiotikum leadás volt tapasztalható a 19. napig, 5-40 µg/ml-es értékeket mértünk. A leadás dinamikáját vizsgálva a 3. napig 38 %-os antibiotikum leadás történt, majd egyenletesen csökkenő tendenciát mutatott a 12. napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,8 µg/ml.

### **Amoxicillin+clavulansav kiáramlás**

Az amoxicillin/clavulansavat tartalmazó kapszulák 10 napig egyenletesen csökkenő leadást mutattak, a 6. napon hirtelen eséssel 10 µg/ml-ről 3 µg/ml-re. Ezután gyorsan csökkenő, majd a 19. naptól mérhetetlen koncentrációkat kaptunk. A kapszulák az 1. napon az összmenyiség 72 %-át adta le, majd igen alacsony értékeket detektáltunk a 12. napig. A gyöngyökből csak a 3. napon volt mérhető a felszabaduló antibiotikum koncentráció igen alacsony, 0,2-0,5 µg/ml volt, mely a 17. nap után már nem volt mérhető. A dinamikáját tekintve is egyenletesen alacsony antibiotikum koncentrációt mértünk 10 napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

### **Cefotaxim kiáramlás**

A cefotaxim tartalmú kapszulákból 100-250 µg/ml koncentrációval szabadult fel az antibiotikum a 13. napig, majd egyenletesen csökkenő leadás volt mérhető a 30. napig. Az antibiotikum leadás dinamikája oly módon alakult, hogy a 3. napig 10 %-ot, majd a 10. napig 87 %-ot adott le, ezt követően még 10 napig egyenletesen alacsony értékek voltak mérhetőek. A gyöngyök esetében alacsony, 20-120 µg/ml koncentrációkat mértünk a 12. napig, majd egyenletesen csökkenőket a méréssorozat végéig. Az antibiotikum tartalom 63 %-a a 3. napig felszabadult, majd a 6. nap után nem mértünk aktivitást. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

## **Anyagok és módszerek IV.**

### **In vivo vizsgálatok**

#### **Kísérletes osteomyelitis létrehozása házinyúl tibia modellben**

A PTE Központi Állatházában eltelt két hetes akklimatizációs periódust követően chronicus osteomyelitist indukáltunk 20 egészséges nőtény házinyúl (2.2-2.3 kg) bal tibiájában. Az operációkat narkózisban végeztük úgy, hogy a narkózis beálltával a műtéti területet 1 %-os Lidocainnal infiltráltuk is. Testsúlykilogrammonként 1-1 ml diazepam (Seduxen®) és ketaminum (Calypsol®, Richter Gedeon Rt., Hungary) intramusculáris adását követően a műtéti területet szörtelenítettük, majd kellő dezinficiálás után (Betadine®, Polyvidonum jodátum komplex, Mundipharma AG-Basel, Svájc) a steril műtéti területre 2-3 ml 1%-os Lidocaint fecskendeztünk. A tibia proximális elülső felszínét tártuk fel kb. 2-3 cm-es metszésből. A tuberositas tibiae magasságában kb. 4 × 8 mm-es csontlemezt véstünk ki, a velőűrt curettáltuk és fiziológiás sóoldattal kiöblítettük. Az eltávolított cortikális darabot öt

percig forró vízfürdőben hagytuk. Ezt a devitalizált csontdarabot, mint preformált sequestert a velőürbe visszahelyeztük és mellé 1 ml  $10^9$  csíra/ml *Staphylococcus aureus* (OKI 118003) fiziológias sóoldatban injiciáltunk és a műtéti sebet két rétegben zártuk.

### Mini kapszulák készítése és Tazocinnal való töltése

Magunk által tervezett és bakelitből és alumíniumból kivitelezett présgépet módosítottuk mini kapszulák készítésére. Azonos nagyságú, de különböző falvastagságú edényeket gyártottunk, melyek 8 mm magas, 6 mm átmérőjű és 0.3-0.6 mm falvastagságúak voltak (0.23 ml űrtartalom). A gyártás során vízőldékony formaleválasztó oldatot használtunk. Ennek a kapszulákról történt eltávolítása után sterilizáltuk, 0.1 ml Tazocin oldattal (0.02 g piperacillin + 0.005 tazobactam; Wyeth-Lederle Pharma, USA) töltöttük és szilikon rúdból készült dugóval zártuk

### Mikrobiológiai vizsgálómódszerek

A bakteriológiai vizsgálatokat közvetlenül a terápiás műtétet megelőzően (sebészi debridement és Tazocin tartalmú kapszula implantációja) a velőürből történt mintavétel után végeztük. A direkt leoltás véres és csokoládé agaron, eozin–metilénkék táptalajon, valamint Holman dúsítóban történt. Ugyanezekre a táptalajokra oltottuk ki a Holman dúsítóból Gram-festéssel telepmorphológiai vizsgálattal és biokémiai próbákkal (Koaguláz teszt, polyprop táptalaj) azonosítottuk a kitenyésztett baktériumokat. A keringésbe jutott antibiotikum mennyiségének meghatározásához minden harmadik napon vérmintát vettünk a nyulakból és a Tazocin koncentrációt mikrobiológiai lemezöntéses technikával vizsgáltuk

### Radiológiai vizsgálatok

Az első röntgenképeket 6 héttel a *Staphylococcus aureus*-szal történt velőür infekció után készítettük, hogy megbizonyosodjunk az osteomyelitis kifejlődéséről. A második radiológiai vizsgálatot a Tazocinnal telt PMMA kapszulák implantációját követő nyolcadik héten végeztük, hogy megítéljük a gyógyulás mértékét, valamint vizsgáltuk a kontroll csoportot is. Független vizsgáló értékelt ki a Rtg felvételeket, aki nem ismerte a kezelési protokollt. Norden és munkatársai (1986) által leírt szemikvantitatív score-rendszer alapján értékelt ki a röntgenfelvételeket. Öt paramétert figyeltek meg minden csont esetén (sequestrált csont formáció, periostealis új csont, csontdestrukció, lágszöveti csont calcificatio, lágszöveti duzzanat mértéke).

## Histológiai vizsgálatok

A második röntgen vizsgálatot követően a 15 állatot altatás után kivérettük, majd a bal csípőízületet exartikulálva eltávolítottuk az állatok végtagját, és mind az implantált, mind a kontroll csoport mintáit szövettani vizsgálatra küldtük. A nyúl combcsont mintákból 4 %-os pufferolt formalinban (PTE ÁOK Gyógyszertár) történt fixálást követően a lágyrészek egy részét eltávolítottuk, a makroszkóposan kóros megjelenésű izom- ill. kötőszövetes területekből szövettani vizsgálatra mintát tettünk félre. A csontos anyagot ezt követően szükség szerint változó ideig (általában 5-7 napig) dekalcináltuk. Több síkban metszeteket készítettünk, ezeket haematoxylin-eosinnal festettük

A szövettani vizsgálatok szemikvantitatív értékelését független patológus végezte a granulocytá szám, a necrosis kiterjedése, a trabecularis corticalis destrukció mértéke, reparációs jelek és a lágyszöveti érintettség kiterjedése alapján. A metszeteket az alább látható szemikvantitatív histológiai rendszer alapján értékeltük, melynek paramétereit magunk határoztuk meg (2. táblázat). Az ezen paraméterek alapján adott pontszámokat összegeztük és így egy összesített osteomyelitis pontszámot kaptunk, melynek maximális értéke 8 volt.

## Eredmények IV.

### A kísérletes osteomyelitis létrehozását követő fizikális, radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

A kísérleteket 20 egészséges állaton végeztük. Első lépésként az összes állatot *Staphylococcus aureus* (OKI 118003) műtétilag fertőztük. Az operált állatokat hetente fizikálisan kontrolláltuk. A műtétet követő harmadik héten négy állatnál étvágytalanságot, gyengeséget, az operált végtag atrofiját és a térdízületi flexiós kontraktúráját figyeltük meg. Az első négy héten öt állat elpusztult septicus szövődmények következtében, ezeket minden értékelés alól kizártuk. A sebek váladékából izoláltuk a *Staphylococcus aureus* OKI 118003-as tesztörzset.

Az osteomyelitis kifejlődése utáni hatodik hét során az összesített radiológiai pontszámok közt nem volt szignifikáns különbség (kontroll csoport:  $5,5 \pm 0,2$ ; a később antibiotikummal kezelt csoport:  $5,3 \pm 0,03$ ). Alapvetően minden állat súlyos osteomyelitisben szenvedett az Rtg képek alapján a második sebészi beavatkozás előtt.

## A sebészi debridement és Tazocin tartalmú kapszula implantációt követő fizikális, mikrobiológiai és radiológiai vizsgálatok eredményei

A postoperatív hatodik héten a röntgen vizsgálat után 12 állatnál végeztünk sebészi beavatkozást, mely során a sebészi debridementet követően Tazocinnal telt mini kapszulákat implantáltunk a velőűrbe, ez volt a tulajdonképpeni kísérleti csoport. A három kontroll állatnál kapszula beültetés nélküli sebészi debridement történt. A következő radiológiai vizsgálatokra a második műtétet követő nyolcadik héten került sor, melyben kiderült, hogy a csont szélesebb és duzzadtabb. A corticalis terület a beavatkozás oldalán vékonyabb a kontroll állatok esetén, mint a PMMA-kapszulákkal kezelt nyulaknál. A klinikai tünetek korreláltak a radiológiai jelekkel: a kontroll állatok bal alsó végtagja atrófiás volt, kontraktúrával a bal térdízületben és solid fisztulával az incisio helyén. Ezzel ellentétben a Tazocin tartalmú PMMA kapszulával kezelt állatok közül 7 teljesen meggyógyult mind fizikálisan, mind radiológiailag. 5 esetben atrófiás bal végtagot és a térdízület minimális kontraktúráját mutatták a fizikális vizsgálatok, valamint a röntgenképek is csak kis duzzanatot mutattak a medullaris régióban. A radiológiai score értékek is szignifikáns különbséget mutattak a két csoport között (kontroll:  $4,8 \pm 0,04$ ; kezelték:  $2,9 \pm 0,03$ ;  $**p < 0,01$ ; Mann-Whitney U-teszt).

Mikrobiológiai vizsgálómódszerrel, lemezőntéses technikával vizsgáltuk, hogy kerül-e antibiotikum, és milyen mennyiségben a szisztémás keringésbe a lokális antibiotikus terápia során. Azt tapasztaltuk, hogy a vizsgálat egész ideje alatt csak egy alkalommal sikerült kimutatni antibiotikumot, mely egy 20mm átmérőjű gátlási zónát hozott létre a becséppentett szisztémás keringésből vett vérminta körül. Mivel csupán ez az egyetlen pozitív eredmény volt a vizsgált időszakban, ezt külső szennyezésnek tulajdonítottuk, mely vagy a mintavétel, vagy a szállítás során keletkezhetett.

## Histológiai vizsgálatok eredményei

A szövettani értékek vizsgálatakor számottevő különbséget találtunk a két csoport között. A histológiai vizsgálatok összességében az antibiotikummal kezelt kísérleti csoportnál hét esetben szövettanilag gyógyulást, három esetben a reparáció jeleit láthattuk és csak két esetben nem tapasztaltuk a gyógyulás semmilyen formáját. Az összesített szövettani score a kontroll csoportban  $6,8 \pm 0,5$ , a Tazocinnal telt PMMA kapszulákkal kezelt csoport esetében  $3,7 \pm 0,4$  ( $p = 0,002$ ). A különbség szignifikánsan kisebb.

## Megbeszélés, új eredmények

A tézis célkitűzéseinek megfelelően olyan antibiotikum hordozó edényt fejlesztettünk ki, melybe bármely gyárilag készült antibiotikum behelyezhető és ez az edény falán áthatolva baktericid koncentrációt képes elérni a fertőzött területeken. Az antibiotikum hordozóul választott anyag a PMMA volt, mely már hosszú ideje használatos a csontsebészetben. A PMMA-t nem a szokásos formában kívántuk alkalmazni (intraoperatív kevert antibiotikum hordozó), hanem már a polimerizáció lezajlását követően kialakított kész edény formájában használtuk fel. Ezen kísérletek és vizsgálatok újdonságnak értékelhető eredményei:

1. In vitro kísérletekkel bizonyítottuk, hogy különböző falvastagságú PMMA lapokon át (0,2-0,8 mm) a clindamycin magas és alacsony koncentrációban is penetrál a fiziológiás sóoldatba a vizsgálat kezdetét követő 4-5. nap után. Azt tapasztaltuk, hogy a tesztkádakban elhelyezett antibiotikum oldatok koncentrációja egyenesen arányos az átáramló antibiotikum mennyiségével.
2. Az általunk vizsgált különböző falvastagságú PMMA lapok antibiotikum áteresztőképessége között nem találtunk szembetűnő lényeges különbséget.
3. Magunk által tervezett és kivitelezett, bakelitből és alumíniumból álló prégépet készítettünk, melynek segítségével különböző falvastagságú vivőedényeket (kapszulákat) tudunk sajtolni és ezen kapszulák segítségével tesztelhetjük a különböző antibiotikumokat in vitro és in vivo vizsgálatokkal.
4. Ugyancsak in vitro vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az általunk kiválasztott antibiotikumok mindegyike a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 MIC értékét több százszor meghaladóan képes penetrálni a különböző falvastagságú kapszulákból.
5. In vitro összehasonlító vizsgálataink során, melynél azonos mennyiségű antibiotikumokat tartalmazó PMMA-gyöngyök és kapszulák antibiotikum kiáramlása között szignifikáns különbséget találtunk a kapszulák javára minden általunk vizsgált antibiotikum esetében.
6. In vivo vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a nyúl tibián létrehozott kísérletes osteomyelitis modellben a sebészi debridement-et követően Tazocin tartalmú PMMA kapszulák beültetése fizikális, radiológiai és histológiai gyógyulást is eredményezett.
7. Mikrobiológiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az in vivo kísérletek során, annak terápiás szakaszában a lokálisan adott antibiotikum a szisztémás keringésbe nem jut be.

## Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálás köszönetemet fejezem ki Prof. Dr Róth Erzsébetnek, programvezetőmnek és Prof. Dr Nyárády Józsefnek, témavezetőmnek, egyben munkahelyi főnökömnek, akik helyes útmutatásukkal, lényegretörő tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm dr Kocsis Béla Tanár Úrnak és Kocsis Erikának a mikrobiológiai vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében végzett nélkülözhetetlen munkáját, valamint azt a baráti biztatást, mely erőt adott a már-már feladni készült feladat elvégzéséhez.

Ezúton köszönöm Prof Dr Seres Lászlónak az elektromikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönöm dr Kereskai Lászlónak a szövettani vizsgálatok elvégzésében és értékelésében végzett hathatós munkáját.

Hálásan köszönöm dr Helyes Zsuzsannának azt a rendkívül sok segítséget és hasznos tanácsot, mellyel hozzájárult munkám létrejöttéhez.

Megköszönöm dr Mintál Tibor, dr Horváth Aranka és dr Koós Zoltán kollégáimnak és barátaimnak a kísérletes munkák során végzett odaadó hasznos segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki Alföldi Éva radiológus szakaszsztensnek az Rtg felvételek elkészítéséért és Szvacsek Ferenc Úrnak a kapszulák előállításához szükséges présgép pontos és gyors legyártásáért.

Szeretnék köszönetet mondani minden kollégámnak és munkatársamnak, akik valamilyen módon segítséget nyújtottak, hozzájárultak munkám sikeres befejezéséhez.

Végül megköszönöm családomnak, feleségemnek, Máriának, lányomnak, Ritának és fiamnak, Artúrnak azt a megértést, türelmet és segítőkész hozzáállást, mellyel körülvettek ez idő alatt.

# **Novel way of specific local antibiotic treatment of suppurative bone infections with polymethylmetacrylate capsule carriers**

PhD thesis

László Zoltán Börzsei M.D.

Leader of the PhD project: Prof. Judit Nagy M.D., PhD., D.Sc.  
Program leader: Prof. Erzsébet Róth M.D., PhD., D.Sc.  
Topic leader: Prof. József Nyárády M.D., PhD.

**University of Pécs, Faculty of Medicine**

Pécs, 2006.



## Introduction

The number of severe chronic bone, joint and soft tissue suppurations has been dramatically increasing recently due to the more frequent high-energy injuries accompanying motorization. Tissue damage promotes bacterial multiplication and invasion. While a few decades ago the most common type of bone infection was haemathogenic osteomyelitis, nowadays the number of exogenous osteitises, osteomyelitises shows permanently increasing tendency.

Nevertheless the treatment of chronic osteomyelitis is based on appropriately radical surgical debridement and long-lasting specified parenteral antibiotic therapy, different techniques of local antibiotic defense (PMMA bead chains, spacers, biodegradable implants) have been more commonly used recently. Since in this manner antimicrobial agents act directly on the affected area and only a small fraction of the applied dose gets into the circulation, the systemic toxic effects of antibiotics can be reduced significantly.

The most commonly used material for local antibiotic therapy is the bone cement. Different types of bone cement consist of two components, usually they are the mixture of solid polymethylmetacrilate (PMMA) and a polymerizing / stabilizing component, mixtures of other compositions are rarely used. Cement stores antibiotics like a sponge, but the exact mechanism of binding has not yet been accurately described. In this form of local antimicrobial therapy, antibiotics have to be water soluble and resistant to heat, because temperature sometimes exceeds 100°C during polymerization of the bone cement. In addition antibiotics must not influence mechanical characteristics of PMMA and has to be available in powder form. The aim of the present study was to develop a novel technique which provides specific, long-lasting local antibacterial effect in cases of osteomyelitis regardless of characteristics of antibiotics that were obligatory for being used in cement.

Supposing that several antibiotics are able to penetrate through the wall of a capsule made of PMMA, not only the water-soluble, heat-stable antibiotics available in powder form could be used for local treatment, but theoretically any antibacterial compounds, too. Consequently, after identification of the infective bacteria and determination of its antibiogram, it would be possible to put the most appropriate antibiotic into the previously produced and sterilized PMMA capsules and use them directly at the site of infection.

## Aims of the study

PMMA is a generally used antibiotic carrier material in orthopedic and traumatologic surgery. This bone cement is commonly used in the treatment of bone and joint suppurations (e.g. chronic osteomyelitis). It is commercially available as local antibiotic carrier in the form of Gentamycin-containing beads or spacers. For this purpose exclusively some heat-stable and water-soluble antibiotics available in powder form can be used, because the 80-100 °C heat produced during PMMA polymerization might destroy the drugs.

If capsules are produced from PMMA sheets after the polymerization procedure, any kind of antibiotics can be filled into these carriers according to the sensitivity spectrum of the respective microorganisms isolated from the purulent secretion. The chosen antibiotics can be inserted into the preformed sterile capsules before and also during the operation. This technique provides novel perspectives in local antibiotic treatment.

1. The aim of the present series of experiments was to produce antibiotic-containing PMMA capsules from which the drugs can be released in high concentrations for long period.
2. Antibiotic penetration through PMMA walls of different diameters is examined *in vitro*.
3. We analyse the correlation between PMMA wall thickness and time-dependent antibiotic permeability.
4. The most appropriate carrier is designed and developed.
5. Time-dependent antibiotic release from capsules with different wall thickness is studied.
6. Comparative studies on antibiotic outflow from PMMA beads and capsules containing the same amount of drugs are performed.
7. *In vivo* experiments are performed to examine the effect of Tazocin-filled PMMA capsules in rabbit osteomyelitis.
8. In this animal model we study if locally administered antibiotic is able to get into the systemic circulation.

## Materials and Methods

### Production of PMMA Bone Cement Sheets

Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone Cement (Howmedica, Rutherford, U.K.) consists of two sterile components containing radiodense material, it has been used in practice for a long time, therefore its characteristics have been thoroughly investigated. The fluidy methylmetacrylate monomer N, N-dimethyl para-toluidine hydroquinone component is sterilized by membrane filtration. The other component of powder consistence, methylmetacrylate-styrene copolymer, PMMA-barium sulphate is sterilized by gamma irradiation. After mixing the two components, the cement mass was placed within two slides localized certain distance from each other: small glass pieces of 0.1 mm width were placed on a slide in two columns, the space between them was filled with bone cement and it was covered by a second slide. After getting dry, the slides were removed from the cement sheets. The PMMA sheets were embedded in silicone and placed as midwalls of small tanks. Water resistance of these walls was previously tested with physiological saline and the tanks were sterilized with gas sterilization. Sheets having 0.2-0.8 mm thickness were produced.

### Examination of clindamycin penetration through the cement walls

Changes of clindamycin concentration in the two compartments of the tanks at different periods, which refers to penetration through the cement walls of different thickness, were examined with microbiological methods under standard conditions. One compartment of the tanks was filled with 2 ml 200 or 300 µg/ml clindamycin (Pharmacia & Upjohn, N. U/ S. A. PUURS, Belgium) and the other compartment was filled with 2 ml physiological saline. Samples were taken every hour and from the third day every 24 hours from the saline and antibiotic concentration was determined, as described below.

### Production and filling of bone cement capsules

Capsules of the same size (15 mm long, 6 mm diameter, 0.3 mm wall thickness) were produced with a pressing machine made of bachelite and aluminium designed and laid out by us. Water soluble form dividing solution was used at the end of the procedure. After removing this solution from the capsules, they were sterilized, filled with 1 ml solution of different

antibiotics and closed with sterile silicone plugs. In each group 6 capsules were filled with one of the following antibiotics with the help of a 2 ml syringe and 23 G needle:

- a. clindamycin: 0.06 g (Pharmacia Upjohn, N. U/S. A. PUURS, Belgium)
- b. amoxicillin-clavulanic acid: 0.02 g + 0.005 g (Richter-Gedeon Ltd., Hungary)
- c. amikacin: 0.1 g (Bristol-Meyers Squibb, Italy)
- d. cefotaxime: 0.1 g (Pfizer, Italy)
- e. piperacillin-tazobactam: 0.08 g (Wyeth, U.K.)

### Production of antibiotic-containing bone cement beads

Surgical Simplex P Radiopaque PMMA Bone cement (5 g powder + 2 ml solvent, Howmedica, Rutherford, UK) was mixed with the respective antibiotic and 6 beads were made by hand under sterile conditions. The average weight of each bead was 1 g and the average diameter was 12 mm. The same antibiotics were used in the same dose as in the capsules.

### Examination of antibiotic penetration from the PMMA capsules and beads

The preformed, closed and sterilized capsules filled with the respective antibiotic solution and the antibiotic-containing PMMA beads were placed into 1 ml physiological saline medium. Amount of antibiotics penetrating from the capsules and the beads was measured with standard microbiological technique as described below.

### Measurement of antibiotic concentration of the medium with a standard microbiological technique

The antibiotic concentration of the medium, which refers to the diffused amount through the PMMA sheets or the release from the capsules and beads, was measured with a standard microbiological technique. In one series of experiments samples were taken every day from the saline by dipping of Macherey-Nagel (MN3) filter discs (Macherey-Nagel Limited U.K.) having 6 mm diameter. In another series, the saline was changed every day after sampling, so the amount of antibiotics released during one day could be determined this way. These discs were placed on Mueller- Hinton agar (OXOID Limited, U. K.) cultures of *Micrococcus luteus* ATCC 9341 test strain and the inhibitory zones were detected after 24 h incubation period on 37°C. Qualitative sign of antibiotic content of the solutions was the presence of inhibitory zones, the width of the zones quantitatively referred to the concentration. The diameter of the

inhibitory zones was measured after 24 h incubation at 37°C and converted to µg/ml antibiotic concentration using standart dilution series. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined with tube dilution technique in case of every antibiotic.

Each experiment was done in triplicate, results are shown as means ± standard error of means. Statistical evaluation of the data has been performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's modified t-test, p values below 0.05 were considered significant.

### Production of Tazocin-containing PMMA capsules for in vivo studies

A pressing machine made of Bakelite and aluminum has been designed and laid out by us for the production of bone cement capsules. Capsules of the same size (8 mm long with 6 mm in diameter), but different wall thickness (0.2-0.6 mm) were produced. Water-soluble form dividing solution was used at the end of the procedure. After removing this solution from the capsules, they were sterilized, filled with 100 µl solution of Tazocin (0.02 g piperacillin-sodium + 0.005 g tazobactam; Wyeth-Lederle Pharma, USA) and closed with sterile elastic silicone plugs.

### Examination of the effect of locally inserted Tazocin-containing PMMA „mini capsules” in experimental osteomyelitis of the rabbit

#### *Induction of osteomyelitis:*

Chronic osteomyelitis was evoked in the left tibia of 25 domestic rabbits after a 2-week-acclimatization period in the Central Animal House of University of Pécs. All the rabbits were male, their average weight was 2.6 kg (2.2-3.2 kg) and they were 7 months old when they got involved in the experiment. Animals in this study were used in accordance with the University Medical School of Pécs Guidelines of Animal Experimentation. Operation was performed under diazepam (Seduxen 0.5 mg/kg i.m.,; Richter Gedeon Rt. Hungary) – ketamine (Calypsol 5 mg/kg i.m.,; Richter Gedeon Rt., Hungary) anaesthesia. The area of the operation was shaved, disinfected with polyvidon-jodide (Betadine; Mundipharma AG, Switzerland) and infiltrated with 2-3 ml 1% lidocaine (Lidocain, ÉGISZ, Hungary). The anterior surface of the proximal part of the tibia was opened through a 2-3 cm incision. A bone sheet of 4-8 mm was resected at the level of the tibial tuberosity, the medullar cavity was curetted and washed with physiological saline. The removed small cortical piece was placed in a hot bath of

physiological saline for 5 minutes. This devitalized bone segment was placed into the medullar cavity as a preformed sequester, accompanied by 1 ml ( $10^9$  /ml) injection of *Staphylococcus aureus* OKI 118003 suspended in saline. The wound was closed in 2 layers. The animals were physically examined every week and symptoms like weakness, loss of appetite, decreased mobility, degeneration of the operated limb or flexion contracture of the affected knee joint have been noted. Radiographs were taken 6 weeks after the operation to confirm osteomyelitis.

#### *Insertion of the PMMA capsules:*

The proximal end of the tibia was opened, sequestrectomy, soft tissue debridement and curettage of the medullar cavity were done under anesthesia after taking bacteriological samples. Tazocin-containing PMMA mini capsules (0.02 g piperacillin + 0.005 g tazobactam in 0.1 ml volume) were placed into the medullar cavity and the wound was closed in 2 layers (n=12). Animals of the control group underwent only debridement, sequestrectomy and curettage with no PMMA capsule implantation (n=7). Six rabbits died due to septic complications within four weeks after induction of osteomyelitis, so they were excluded from any further examination. Hence every result and conclusion below are based on the examination of the remained 19 animals.

#### *Microbiological examinations:*

Bacteriological examination was immediately performed from the surgical samples, which were directly inoculated onto blood agar, chocolate agar, eosine-methylene blue agar plates as well as aerobic and anaerobic Holman media. The colonies were identified by microscopic and biochemical tests. Blood samples were taken every third day and Tazocin concentration was examined by microbiological agar diffusion technique in order to detect the antibiotic level in the circulation. The sensitivity of this method is 0.5 µg/ml. The minimum inhibitory concentration (MIC) of Tazocin on *Micrococcus luteus* ATCC 9341 was determined by tube dilution method.

#### *Radiological examination:*

The first radiographs were taken 6 weeks after infection of the medullar cavity with *Staphylococcus aureus* to prove the development of osteomyelitis. The second series of radiological studies were performed 8 weeks after the second operation in order to assess the healing of the osteomyelitis. One observer, who had no knowledge of the type of the second

operation, evaluated all roentgenograms. The X-Ray pictures have been evaluated according to a semiquantitative scoring system described by Norden et al. Five parameters (sequestral bone formation, presence of periosteal new bone, presence of bone destruction, presence of soft tissue calcification, presence of soft tissue swelling) were determined for each bone. Using the criteria shown in Table 1, a numerical score was assigned to each variable, and the five scores have been added to form a composite radiological score with a maximum of 6 for representing radiographic severity.

#### *Histological examination:*

The rabbits were sacrificed by cervical dislocation and the hindlimbs were dissected for histological studies 9 weeks after the therapeutic operation.

Semiquantitative scoring of the histological slides based on the number of granulocytes and the extent of necrosis, trabecular/ cortical destruction, reparation signs and soft tissue involvement has been performed with an expert pathologist blinded from the study.

For comparing the results of both the radiological and the histological evaluation regarding the treated and control groups, statistical analysis has been performed with unpaired Student's t-test, where p values <0.05 were considered significant.

## Results

### Penetration of clindamycin through PMMA membrane

Clindamycin both from the 200 and 300 µg/ml solutions diffused through the bone cement wall into the saline in detectable amount after 4-5 days.

### Release of clindamycin from PMMA capsules and beads

From the capsules high antibiotic outflow (2000-5000 µg/ml) was detected during the whole examination period of 32 days. On the contrary, in the case of the beads, much smaller concentrations (100-500 µg/ml) were measured in the medium for shorter time (17 days). When the medium was changed every day, we experienced that more than 53% of the total antibiotic content of the capsules was released within the first day. The dynamics of the outflow from the beads was also slower, only 12% of the total content was released during the first day and gradually decreasing amount

was measured till the 15th day. The MIC value for *Micrococcus luteus* was 0.1 µg/ml. The capsules remained intact *in vitro*, we noticed no damage, perforation or microfractures upon their macroscopic examination.

### Release of amoxicillin-clavulanic acid from the capsules and beads

From the capsules these antibiotics were released during 10 days in a gradually decreasing manner, a rapid decline was observed from 5 to 1.5 µg/ml on the 6th day and no release was detectable from the 19th day. On the other hand, there was only minimal release from the beads, the concentration did not go above 0.1-0.25 µg/ml. The first day release from the capsules was 72% of the total dose, then very small concentrations were measured till the 12th day. Meanwhile, the dynamics of the release from the beads was minimal throughout 10 days, which is likely to be due to the damage of the antibiotics induced by the heat during polymerization of the PMMA. The MIC value for *Micrococcus luteus* was 0.1 µg/ml.

### Release of amikacin from capsules and beads

The outflow of amikacin from the capsules was high (850 µg/ml) till the 15th day, then decreased and stabilized at the concentration of 180-200 µg/ml. In case of the beads, smaller, 200-250 µg/ml concentrations were measured in the medium till 15th day, then it gradually decreased to 0. Within the first day, 56% of the total antibiotic content of the capsules was released, then gradually decreasing concentrations were detected every day till the 9th day. The daily antibiotic outflow from the beads decreased gradually till the 8th day. The MIC value for *Micrococcus luteus* was 0.1 µg/ml.

### Release of piperacillin-tazobactam from capsules and beads

The release of piperacillin-tazobactam from the capsules was high with the maximum of 750 µg/ml till the 15th day, then after a steep decline no detectable antibiotic concentration could be observed. In case of the beads, markedly smaller, maximum 180 µg/ml concentrations were measured in the medium till 15th day, then it gradually decreased to 0. Within three days, 69% of the total antibiotic content of the capsules was released, then gradually decreasing concentrations were detected every day till the 12th day. From the beads 38% was released during three days, then



decreased gradually till the 12th day. The MIC value for *Micrococcus luteus* was 0.8 µg/ml.

### Release of cefotaxim from capsules and beads

The release of cefotaxime was detectable from both the capsules and the beads, but it was higher from the capsules (60-150 µg/ml) than from the beads (12-50 µg/ml). From the capsules, 10% was released during 3 days, while 87% was released during 10 days. On the contrary, 63% of the total content flew out during the first three days and no antibiotics remained after the sixth day. The MIC value for *Micrococcus luteus* was 0.1 µg/ml.

### Effect of Tazocin-containing PMMA capsule implantation on experimental osteomyelitis of the rabbit tibia

The animals were controlled by physical examination every week after the induction of osteomyelitis. On the third week after the operation loss of appetite, weakness, signs of atrophy of the operated limb and flexion contracture of the knee joint were observed in cases of 5 animals. Six rabbits died within the first four weeks due to septic complications, therefore they were excluded from any further evaluation. We could isolate the *S. aureus* OKI 118003 from the pus collected from the osteomyelitis. Radiographs taken on the sixth postoperative week confirmed osteomyelitis in all the remaining 19 cases. The composite radiological scores 6 weeks after the induction of the osteomyelitis did not differ significantly, they were  $5.5 \pm 0.2$  in the control and  $5.3 \pm 0.03$  the later antibiotic-treated groups. It means that basically all the animals showed severe osteomyelitis by radiographic evaluation before the second surgery. The next series of radiological examination carried out eight weeks postoperatively revealed that the bone was more swollen, wider and the cortical area was thinner at the site of injury in control animals compared to the findings of rabbits treated with PMMA capsules. Physical symptoms were parallel with the radiological signs: in control rabbits the left hindlimb was atrophic, there was a contracture in the left knee joint and a solid fistula was seen at the site of incision. On the contrary, from the animals treated with Tazocin-containing PMMA capsules, 7 were completely cured both physically and radiologically, in 5 cases atrophic left hindlimbs and minimal contracture of the knee joints were detected by physical examination and radiographs showed only small swelling of the medullar region. The score

values showed marked difference between the two groups representing  $4.8 \pm 0.04$  in control and  $2.9 \pm 0.03$  in PMMA capsule-treated rabbits, respectively ( $p=0.006$ ).

After killing the rabbits at the end of the experiment all the implanted capsules were found to be intact, no damage of them could be detected. In the control group, macroscopically, enlargement of the medullar cavity with thin cortical area was seen in the tibia at the site of infection. In the central part of the samples a yellowish-white substance was found, which proved to be necrotic tissue full of granulocytes and degrading cells on the histological preparations. The surrounding cortical bone was widened and showed only some signs of reparation with an irrelevant restructuring of the neighboring trabecular bone. Slight reparation, formation of fibrotic tissue and scar, chronic inflammatory signs were seen in the intertrabecular spaces. In the animals treated with Tazocin-containing PMMA capsules, the tibia did not show macroscopic enlargement, only at the localization of the capsules. Microscopically, intact haemopoetic tissue of the bone marrow was found in the medullar cavity. Signs of only minimal chronic inflammation were seen in the surrounding trabecular and cortical bone tissue with small fibrosis, the width of the cortical area was normal. As result of the evaluation histological healing was achieved in 7 animals, initiation of the reparative phase was observed histologically in 3 cases and no reparative signs were detected in 2 rabbits. The composite histological osteomyelitis score in the control group, in which only surgical debridement was performed without antibiotic implantation was  $6.8 \pm 0.5$ . In rabbits treated with local tazocin-containing PMMA capsules, this score was significantly smaller, only  $3.7 \pm 0.4$  ( $p=0.002$ ).

## Summary of Novel Results

We have developed a novel antibiotic carrier, which can be filled with any original antibiotic chosen on the basis of the sensitivity of the respective microorganism. The antibiotics can reach bactericidic concentrations in the infected area after penetrating through the wall of these carriers. The material used for the production of these carriers is PMMA, which has been used in bone surgery for a long time. However, we did not intend to apply this in its usual form (intraoperative prepared spacers), but created capsules after its polymerization with the help of a self-developed pressing machine and filled these with different antibiotics.

1. We have provided *in vitro* evidence that clindamycin is able to penetrate through PMMA sheets (0.2-0.8 mm) both from low and high concentration solutions after 4-5 days. The speed and extent of penetration was dependent on the antibiotic concentration.
2. However, there was no significant difference between antibiotic penetration in cases of different wall diameters.
3. We produced specific antibiotic carrier PMMA capsules with different wall diameters with the help of a self-designed and created pressing machine made of bachelite and aluminium. These capsules were filled with several antibiotics which were examined in further *in vitro* and *in vivo* studies.
4. We have demonstrated *in vitro* that all the 6 chosen antibiotics are able to penetrate through the wall of these capsules in more than 100 times higher concentration than the MIC values of the *Micrococcus luteus* ATCC 9341 test stain.
5. Further *in vitro* comparative studies revealed that there was a significantly greater release from PMMA capsules than beads containing the same amount of antibiotics.
6. We have provided *in vivo* data showing that implantation of Tazocin-containing PMMA capsules in the experimental rabbit tibia osteomyelitis model results in physical, radiological and histological healing.
7. In this *in vivo* model we have shown with microbiological assessments that locally administered Tazocin does not get into the systemic circulation.

## Publications

### Original articles

1. Kovácsy Á., **Börzsei L.**, Schmidt L., Péley I. A n. medianus és n. ulnaris együttes sérülése Magyar Traumat. Orthop. Helyreállító Seb. 1991, 34: 107-115.
2. Than P., **Börzsei L.**, Pomeroy D. Térdízületi totál endoprotezis beültetést követő supracondiler femur törés megoldása reteszelt retrográd intrameduláris fixatioval. Magyar Traumat. Orthop. XVII évf. 1999, 4: 324-331.
3. Sebestyén A., Tóth F., **Börzsei L.**, Gacs B. Trochanter táji törések globális költséghatékonysági vizsgálata. Magyar Traumat. Orthop. 2000, 1: 57-62.
4. **Börzsei L.**, Mintál T., Kocsis B, Nyárády J. Különféle antibiotikumok penetrációja polymethyl- metacrylat kapszulák falán keresztül. Magyar Traumat. Orthop. 2005. 3 233-243.
5. **Börzsei L.**, Horváth A, Kocsis B, Nyárády J.: Polymethylmetacrylatból készült antibiotikum hordozó kapszulák és gyöngyök összehasonlító vizsgálata Magyar Trauma. Orthop. 2005. 3 243-251.
6. **Börzsei L.**, Mintál T, Kocsis B, Kereskai L, Nyárády J: Célzott, lokális, antibiotikus terápia lehetősége PMMA kapszulák közvetítésével. Magyar Traumat. Orthop. 2005. 3 251-261
7. **L Börzsei**, T Mintál, A Horváth, Z Koós, B Kocsis, J Nyárády: Comparative study of antibiotic-containing polymethylmetacrylate capsules and beads  
Chemotherapy 2006, 52:1-8 **IF: 1,248 (2004)**
8. **L Börzsei**, T Mintál, Z Koós, B Kocsis, Zs Helyes, L Kereskai, J Nyárády: Examination of a novel, specified local antibiotic therapy through polymethylmethacrylate capsules in a rabbit osteomyelitis model  
Chemotherapy 2006,52:73-79 **IF: 1,248 (2004)**
9. **Börzsei L.**, Mintál T., Horváth A., Kocsis B., Kereskai L. PMMA –ból készült kapszulák, mint lokális antibiotikum hordozók. In vitro-in vivo kísérletek  
Magyar Traumat. Orthop.2006(1) 57-67
10. Ezer F, **Börzsei L.**:A palmáris longus rendellenessége miatt kialakult carpális alagút szindróma.  
Magyar Traumat.Orthop.2006(1) 85-89

### Published, peer-reviewed abstracs

1. Kovácsy Á. Vámhidy L. **Börzsei L.** Eredics T. Male sanalt típusos helyi radius törések korrekciója Fernandez szerint.  
MOT 40.kongresszusa Abstrack book 173 1997. 06 19-21

2. Vámhidy I Kovácsy Á Eredics T **Börzsei L.** Radius distális vég törések kezelési protokollja az eredmények javítására.  
MOT 40. Kongresszusa Abstract book 167 1997 06. 19-21
3. **Börzsei L.**, Mester S Sebestyén A supracondiler femurtörés zárt repositiója és intrameduláris fixatiója térd arthroplasticát követően.  
MTT Vándorgyűlés Kecskemét Supplementum 49. 1998. 09.17-19
4. Borsiczky B, Sebestyén A., **Börzsei L.**, Róth E., Nyárády J. Perfúziós áramlások vizsgálata és terápiás aspektusai.  
MTT Vándorgyűlés Kecskemét Supplementum 101. 1998. 09. 17-19.
5. **Börzsei L.**,Mintál T., Kocsis B., Nyárády J., Antibiotikumok penetrációjának vizsgálata polymethylmethacrylat falon keresztül.  
XVIII.Nagyar Kísérletes Sebészeti Kongresszus Pécs 2001.08.30-09.01  
Magyar Sebészet Supplementum
6. **Börzsei L.**,Mintál T.,Kocsis B.,Kereskai L., Nyárády J. Antibiotikumot tartalmazó PMMA kapszulák terápiás hatása állatkísérletekben.  
XVIII.Nagyar Kísérletes Sebészeti Kongresszus Pécs 2001.08.30-09.01  
Magyar Sebészet Supplementum
7. Mintál T Kocsis B., **Börzsei L.**, Nyárády J. Célzott, intraoperatív, lokális antibiotikum terápia lehetősége polymethylmethacrylat kapszulák közvetítésével.  
XVIII.Nagyar Kísérletes Sebészeti Kongresszus Pécs 2001 .08.30-09.01  
Magyar Sebészet Supplementum
8. T.Mintál B.Kocsis.,**L.Börzsei.**,J. Nyárády.: Opportunity for specific,local,intraoperative antibiotic therapy with the help of polymethylmethacrylate capsules.  
Central European Orthopedic Congress /CEOC/ May 29-June 01, 2002 Cavtat-Dubrovnik  
Book of Abstracts O-043
9. **L. Börzsei**, T. Mintál ,B. Kocsis, J. Nyárády .: Examination of antibiotic penetration through the wall of polymethylmethacrylate capsules  
Central European Orthopedic Congress/CEOC/ May 29-June 01 2002 Cavtat-Dubrovnik  
**Book of Abstracts P-052**
10. **L Börzsei**, T Mintál. Synthesis of supracondylar femoral fracture following knee arthroplasty with intramedullary nailing at our department  
Central European Orthopaedic Congress / CEOC/ May 29-June 01,2002 Cavtat-Dubrovnik  
Book of Abstracts O-039
11. **Börzsei L.**, Nyárády J. Marchetti-Vichensi nyalábszegezés retrográd alkalmazása combcsont törések esetében.  
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció-XIX. Kongresszus 2003 Szept 11-13 Siófok.  
Magyar Sebészet LVI. Évf. 2003 Aug.3-4 162 P-04

12. **Börzsei L.** Mintál T., Kocsis B., Kereskai L., Nyárády J.: Új lokális antibiotikum- hordozó módszer alkalmazása nyúl osteomyelitis modellen.

Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció-XIX. Kongresszus 2003 Szept 11-13 Siófok

Magyar Sebészet LVI. Évf.2003 Aug.3-4 141

13. **L. Börzsei**, T. Mintál, A. Horváth, B. Kocsis, J. Nyárády: Comparative study of antibiotic-containing polymethyl metacrylate capsules and beads

Eur Surg Res, 2005, 37(S1): 108.

**IF: 0.750 (2004)**

14. Sebestyén A., Boncz I., **Börzsei L.**, Nyárády J. DRG-based cost analysis of femur neck fractures in patients with and without complications using the Hungarian HBCs system.

Eur Surg Res, 2005, 37(S1): 18.

**IF:0.750 (2004)**

15. Boncz I., Sebestyén A., **Börzsei L.**, Nyárády J. Market share and progressivity in surgery according to the system of Diagnosis Related Groups (DRGs)

Eur Surg Res, 2005, 37(S1): 19.

**IF:0.750 (2004)**

16. Máthé T, Novák L,**Börzsei L**,Boncz I,Sebestyén A,Tóth D,Móricz O. New Type uncemented hip prosthesis

Eur.Surg.Res,2006 38(S1):145

**IF:0.750 (2004)**

17. Máthé T, Móricz O,**Börzsei L**,Boncz I,Sebestyén A,Tóth D .Comprehensive study of bridging 10-20mms longnerve defects with autologus vein and pga tubes

Eur.Surg.Res,2006 38 (S1):146

**IF:0.750 (2004)**

18. Sebestyén A, Boncz I,Mintál T, Máthé T,**Börzsei L**, Nyárády J. The importance of Garden classification in the selection of primary surgical treatment of medial femoral neck fracture according to further surgical interventions

Eur.Surg.Res,2006 38 (S1):146

**IF:0.750 (2004)**

19. Sebestyén A,Boncz I,Mintál T,Máthé T,**Börzsei L**,Nyárády J .Anaysis of the type of further surgical interventions after primary treatment of medial femoral neck fracture in working age group according to the primary type of operation

Eur.Surg.Res,2006 38 (S1):147

**IF:0.750 (2004)**

20. Boncz I, Sebestyén A, Ghodrattollah N,Fodor B, **Börzsei L**, Ember I.Nyárády J,Péntek M, Gulácsi L. Measuring the market share of osteoporosis centers from outpatient care financing in Hungary.

Osteoporpsis Int, 2006,17(S2): S82-S83.

**IF:2,954 (2004)**

**Cummulative impact factor :9,600**

### Oral presentations about the topic:

1. **Börzsei L.** Modelkísérlet antibiotikumok PMMA-n keresztüli penetrációjának vizsgálatára  
MTT Vándorgyűlés  
Pécs 1999 ápr 08-10
2. **Börzsei L.**, Mintál T., Kocsis B., Nyárády J. Antibiotikumok penetrációjának vizsgálata polymethylmethacrylat falon keresztül  
XVIII. Magyar Kísérletes Sebészeti Kongresszus  
Pécs 2001 aug.31-szept.01
3. Mintál T., Kocsis B., **Börzsei L.**, Nyárády J., Célzott, intraoperatív, lokális antibiotikum terápia lehetősége polymethylmethacrylat kapszulák közvetítésével  
XVIII.Magyar Kísérletes Sebészeti Kongresszus  
Pécs 2001 aug 31- szept 01
4. T. Mintál, B. Kocsis, **L. Börzsei**, J.Nyárády. Opportunity for specific,local, intraoperative antibiotic therapy with the help of polymethylmethacrylate capsules  
Central European Orthopedic Congress  
Cavtat-Dubrovnik may 29-june 01. 2002
5. **L. Börzsei**, T. Mintál, B. Kocsis, J. Nyárády., Examination of antibiotic penetration through the wall of polymethylmethacrylate capsules.  
Central European Orthopedic Congress  
Cavtat-Dubrovnik may 29-june 01. 2002 Poster
6. **Börzsei L.**, Mintál T., Kocsis B., Kereskai L., Nyárády J., Antibiotikumot tartalmazó PMMA kapszulák terápiás hatása állatkísérletekben  
XVIII.Magyar kísérletes Sebészeti Kongresszus  
Pécs 2002 aug. 30- szept.01.
7. **Börzsei L.**, Mintál T., Kocsis B., Kereskai L., Nyárády J. Új célzott lokális antibiotikum terápia lehetősége nyúl osteomyelitis modellen  
MOT.46.Kongresszusa –nemzetközi részvétellel  
Budapest 2003.jun.19-21.
8. **Börzsei L.**, Mintál T., Kocsis B., Kereskai L., Nyárády J. Új lokális antibiotikum- hordozó módszer alkalmazása nyúl osteomyelitis modellen.  
Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebész Szekció-XIX. Kongresszus  
Siófok 2003 Szept 11-13
9. **Börzsei L.**, Horváth A., Kocsis B., Nyárády J: PMMA-ból készült antibiotikum hordozó kapszulák és gyöngyök összehasonlító vizsgálata.  
A Magyar Traumatológus Társaság 2004. évi Kongresszusa,  
Balatonfüred 2004. szeptember 23-25.

10. **L. Börzsei**, T. Mintál, A. Horváth, B. Kocsis, J. Nyárády, Comparative study of antibiotic-containing polymethyl metacrylate capsules and beads  
7th (EFORT) Congress of the European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology  
Portugal, Lisboa, 4-7 June 2005.

11. Mintál T, Ezer F, Máthé T, **Börzsei L**, Boncz I, Sebestyén A, Tóth F: New possibilities of specific antibiotic therapy in the osteomyelitis rabbit model.  
Eur.Surg.Res.2006,38(S1) 135 P 47

**Other presentations: 46**