

- ¹В. І. Мазур, д-р техн. наук, професор,
¹С. В. Капустнікова, канд. техн. наук, старш. наук. співроб.,
¹А. В. Мазур, канд. техн. наук, старш. наук. співроб.,
¹С. В. Бондарев, асист.,
²Р. Г. Васильєв, наук. співроб.,
²І. Ф. Лабунец, канд. мед. наук, старш. наук. співроб.

МЕТАЛОКЕРАМІЧНІ СПЛАВИ НА ОСНОВІ ТИТАНУ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ІМПЛАНТОЛОГІЇ

- ¹Національна металургійна академія України, м. Дніпропетровськ
²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»,
м. Київ

Досліджено структуру та фазову сполуку нового металокерамічного сплаву на основі титану. Визначено фізичні та механічні властивості цього сплаву. Проведено порівняльні дослідження біосумісності металокерамічного сплаву та сплавів, які широко використовуються в цей час в імплантології. Встановлено, що новий металокерамічний сплав на основі титану не проявляє цитотоксичності при дослідженні на біосумісність у тестах in vitro.

Вступ. На теперішній час розроблено багато композицій на основі титану, які проходять випробування та використовуються як в ортопедичній медицині, так і в дентальному протезуванні. В більшості – це сплави, легуючий комплекс яких забезпечує утворення твердих розчинів на основі титану. Вони стали альтернативною групою матеріалів відносно нержавіючих сталей та кобальтохромових сплавів, що застосовуються і тепер в медицині. Однак твердорозчинні титанові сплави мають недостатньо високі механічні властивості, низьку стійкість проти гідроабразивного зношення і саме важливе – вони мають недостатньо стабільну біологічну сумісність при багаторічному контакті з тканинами організму.

Усунення цих недоліків можливо досягнути коригуванням хімічного складу сплаву та різними видами обробки, як у твердому, так і в рідкому стані. Від вибору легуючого комплексу залежить об'ємна частка α - і β - фаз в сплавах на основі титану, силіцидних та інтерметалід-

них фаз, утворення нових структурних складових, що позначається на рівні властивостей матеріалу. Легування титану елементами, які сприятимуть утворенню евтектичної або евтектоїдної структурної складової та не погіршать біохімічні властивості, зокрема біосумісність з тканинами, дозволить підвищити властивості матеріалу в порівнянні з твердорозчинними титановими сплавами.

Відомо, що першою відповіддю організму на імплант є запальна реакція на нього як на чужорідне тіло, результатом чого може бути його інкапсуляція сполучною тканиною [1]. Метою остеоінтеграції металевих імплантів в ортопедії та стоматології є швидке та надійне досягнення механічно стабільного стику між імплантом та кісткою [2]. За оптимальних умов кістка здатна приймати імплант як частину власного позаклітинного матриксу [3]. В цьому випадку досягається ригідна фіксація імпланту в кістці без негативних клінічних проявів під час функціонально навантаження. Клітинами, які здатні до утворення нової кісткової тканини, є остеобласти, остеопрогеніторні клітини ендосту та періосту та мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини кісткового мозку (ММСК) [4]. Усі ці клітинні типи є адгезивними, тобто їх виживання та проліферація залежать від контакту з субстратом. Тобто, якщо поверхня імпланту не здатна підтримувати прикріплення остеопрогеніторних клітин, то такий імплант не зможе інтегруватися у кістку. І навпаки, якщо поверхня імпланту сприяє прикріпленню остеопрогеніторних клітин, це призводить до продукції ними позаклітинного матриксу та інтеграції імпланту у кісткову тканину. Дослідження біосумісності нових матеріалів для виготовлення імплантів за допомогою тест-систем *in vitro* є першим кроком до їх впровадження в клінічну практику.

Мета дослідження. Дослідити структуру, фізичні та механічні властивості нового металокерамічного сплаву на основі титану та провести попереднє дослідження його біосумісності в тест-системі *in vitro*.

Методика досліджень. 1. Дослідження властивостей нового металокерамічного сплаву на основі титану. На основі аналізу науково-технічної та медичної літератури, багаторічного досвіду авторів в розробці зносостійких та тепломіцних титанових сплавів і композиційних матеріалів на основі титану було обрано систему легування та виплавлено сплави різного хімічного складу.

Чотирьохкомпонентні сплави системи Ti-Zr-Nb-Si виплавляли в лабораторній установці вакуумної дугової плавки в атмосфері аргону. Компоненти шихти розміщували в лунках мідного охолоджуваного водою кристалізатора, розплавляли там же дугою, після чого розплави кристалізувались у вигляді зливків розмірами 10×20×70 мм. Для забезпечення однорідності зливків по хімічному складу та структурі кожний з них переплавляли не менше 2 разів.

Дослідження структури та фазового складу експериментальних сплавів проводили з використанням стандартних методик. Твердість сплавів визначали на приладі Віккерса. Для визначення механічних властивостей (межі міцності, межі плинності, модуля пружності, пластичності) використовували метод випробувань на статичний трьохточковий вигин за методикою, подібною до стандартної для композитних матеріалів за ГОСТ 25.604-82.

2. Дослідження біосумісності нового металокерамічного сплаву на основі титану в тест-системі *in vitro*. На першому етапі дослідження біосумісності нового титанового сплаву нами було обрано за мету оцінити його пряму та непряму цитотоксичність (відповідно до ISO 10993-5 «Biological evaluation of medical devices. Part: Test for *in vitro* cytotoxicity» [5]) та здатність підтримувати адгезію клітин. У якості клітинного об'єкту дослідження були обрані ММСК кісткового мозку, які здатні до диференціювання у остеобласти та приймають участь у репарації кісткової тканини *in vivo*.

Очистка та стерилізація зразків, що досліджувалися. Досліджувані зразки (№1 – сплав VT1-0, №2 – сплав VT-6, №3 – експериментальний титановий сплав (Ti-Nb-Zr-Si)) були очищені шляхом механічної обробки щіткою. Після механічної обробки зразки відмивали дистильованою водою та поміщали на 3 год у 96° етиловий спирт для видалення жирового забруднення. Потім зразки відмивали дистильованою водою та стерилізували у сухожаровій шафі при +180° С протягом 1 год.

Отримання та культивування клітин. Оцінка цитотоксичності титанових сплавів проводилась на культурі ММСК кісткового мозку дорослих мишей лінії FVB. Для евтаназії мишей застосовували передозування ефіру медичного. У стерильних умовах виділяли стегнові кістки. Клітини отримували шляхом вимивання кісткового мозку з стегнових кісток поживним середовищем RPMI-1640.

10×10^6 ядровмісних клітин вносили до чашки Петрі діаметром 60 мм у 5 мл поживного середовища RPMI-1640, що містило 10 % ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 2 мМ L-глутаміну, 10 ОД/мл пеніциліну та 10 мкг/мл стрептоміцину. Культивування клітин проводили при $+37^\circ \text{C}$ у зволоженої атмосфері з концентрацією CO_2 5 %. Першу зміну ростового середовища проводили через 72 год., в подальшому – 2 рази на тиждень. Після досягнення 90 % конфлуентності ММСК пересівали у співвідношенні 1:3. Для цього ростове середовище видаляли, клітини промивали 2 рази розчином PBS та інкубували протягом 5 хв у 0,05 % розчині трипсин-EDTA. Дію трипсину зупиняли додаванням 10 % ЕТС, клітини збирали шляхом їх піпетування та центрифугували 5 хв при 200 g. Клітинний осад ресуспендували у ростовому середовищі та переносили до нових чашок Петрі діаметром 60 мм у вказаному співвідношенні. В експерименті використовували клітини 1-го пасажу.

Оцінка непрямой цитотоксичності [5]. Зразки, що досліджували поміщали у лунки 6-лункового культурального планшету в 1 мл ростового середовища (RPMI-1640 з 10 % ЕТС) та інкубували при $+37^\circ \text{C}$ протягом 24 годин. Після цього водний екстракт в стерильних умовах збирали та використовували для дослідження непрямой цитотоксичності. Для цього по 10^4 ММСК поміщували у лунки 96 лункового планшету в 100 мкл ростового середовища (RPMI-1640, 10 % ЕТС, 2 мМ L-глутаміну, 10 ОД/мл пеніциліну та 10 мкг/мл стрептоміцину). Після адгезії клітин протягом 24 год середовище замінювали на 100 мкл водного екстракту зразків, що досліджувалися. У якості контролю проводили інкубацію клітин у ростовому середовищі. Клітини культивували 72 год. За дві години до кінця інкубації в кожну лунку вносили по 100 мкл 0,5 % розчину МТТ (3-(4,5-диметилтіазол)-2,5-дифенілтетразол бромід) у ростовому середовищі. Через 2 години інкубації при $+37^\circ \text{C}$ утворені кристали формазану розчиняли у 0,15 мл 0,04 М розчину HCl у ізопропіловому спирті та вимірювали оптичну щільність надосаду на мікропланшетному фотометрі фірми «Labsystems» при довжині хвилі 492 нм.

Оцінка прямої цитотоксичності. Дослідження здатності клітин до адгезії. Для оцінки адгезивних властивостей та прямої цитотоксичності, зразки поміщували у лунки 6-лункового планшету та додавали 10^5 ММСК в 100 мкл ростового середовища. Після

години інкубації у кожному лунку додавали по 2 мл ростового середовища. Через 48 год культивування середовище видаляли, зразки промивали розчином фосфатно-сольового буфера, фіксували холодним 96° етиловим спиртом та фарбували за Романовським-Гімза для візуалізації клітин, що адгезували.

Результати та їх обговорення. 1. Фізико-механічні властивості нового металокерамічного сплаву на основі титану. Структура литих зразків чотириккомпонентного сплаву, що містить менше ніж 2%мас. Si характеризується наявністю поліедричних зерен перетвореної β -фази, оторочених світлою α -фазою; присутні також дрібні кристали силіциду титану, які розташовані як в тілі зерен, так і по їх межах. При значних збільшеннях ($\approx 2000\times$) видно, що перетворені β – зерна складаються з α - колоній, що являють собою паралельні α -пластини розділені прошарками β - фази (рис. 1).

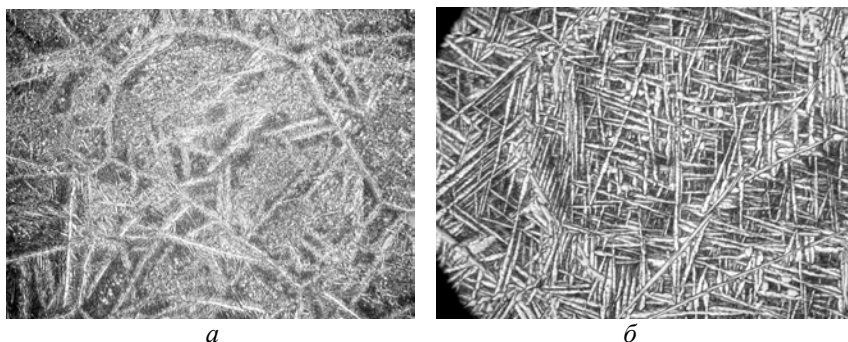


Рис. 1. Мікроструктура сплаву в литому стані:
 $a - \times 400$; $b - \times 2000$

Структура сплавів з вмістом Si більше 2% мас. представлена дендритами перетвореної β -фази та евтектикою $\beta + \text{Ti}_5\text{Si}_3$ (рис. 2). В залежності від вмісту Si змінюється об'ємна частка структурних складових і морфологія β -дендритів. Зі збільшенням концентрації кремнію спостерігається потоншення перетину гілок β -дендритів і зростання об'ємної частки евтектичної складової, яка має дуже дрібнодиференцьовану морфологію.

Використання методів кількісного металографічного аналізу дозволило визначити точку евтектичної рівноваги $L \leftrightarrow \beta + \text{Ti}_5\text{Si}_3$ $\beta + \text{Ti}_5\text{Si}_3$ і точку обмеженої розчинності Si в твердому розчині на

основі β -Ti для сплавів системи Ti-Zr-Nb-Si, які досліджувались. Для цих сплавів евтектична концентрація кремнію знаходиться в інтервалі 6,9...7,1% Si мас., межа граничної розчинності Si в β -Ti – в інтервалі 1,9...2,2% Si мас.

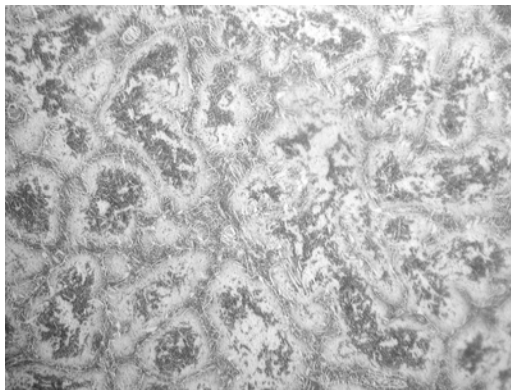


Рис. 2. Мікроструктура сплаву Ti-Zr-Nb-Si, $\times 400$

В попередніх дослідженнях складнолегованих сплавів на основі системи Ti-Si було показано, що такі елементи як Zr і Al зміщують точку трифазної рівноваги в область більш низької концентрації Si [6]. Зсув евтектичної концентрації до вказаної межі (6,9...7,1%Si мас) в сплавах, що досліджувались в цій роботі, обумовлений впливом не тільки Zr але й Nb.

Результати фазового аналізу литих сплавів, які отримані завдяки використанню рентгенівських методів досліджень, показали наявність таких фаз: α – Ti, β – Ti та силіцидів Ti_5Si_3 і $ZrSi_2$. Рентгенограма сплаву наведено на рис. 3.

На отриманих рентгенограмах зафіксовано зсув максимумів інтерференцій α - та β -фаз в порівнянні з еталонними.

Слід підкреслити, що для α -фази зсув спостерігається в бік великих кутів, а для β -фази – в бік малих кутів, що обумовлено різною розчинністю легуючих елементів в кристалічній ґратці цих двох фаз.

Наявність силіцидних фаз в титанових сплавах сприяє підвищенню їх корозійної стійкості в агресивному середовищі, а також міцності, зносостійкості та покращенню механічної оброблюваності [7; 8].

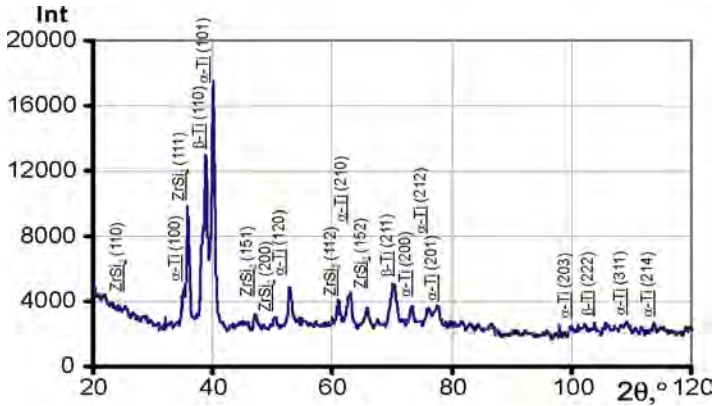


Рис. 3. Рентгенограма сплаву

Випробування на статичний триточковий вигин дозволили визначити не тільки міцнісні та пластичні властивості, але й таку важливу характеристику для матеріалів, що використовуються в імплантології, як модуль пружності. На рис. 4 наведено діаграма випробувань одного із зразків металокерамічного матеріалу.

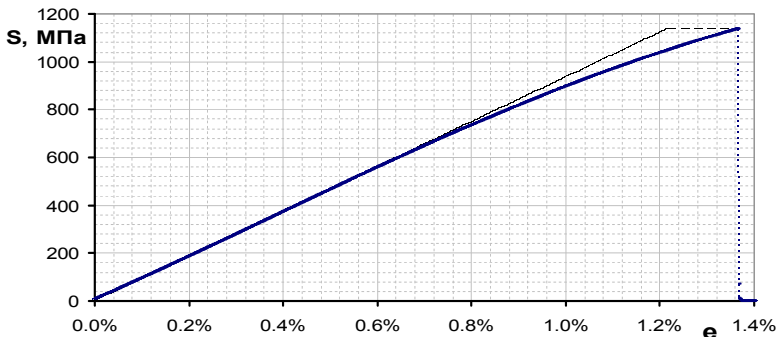


Рис. 4. Діаграма механічних випробувань зразка експериментального сплаву

На цій діаграмі чітко видно непружний характер деформацій, що передують руйнуванню. Пряма лінія, дотична кривій деформації відображає закон Гука та відповідає визначеним показникам модуля пружності. Відхилення від цієї прямої в момент руйнування взято за показник залишкової деформації

Результати випробувань були оброблені статистичними методами. Середні показники межі міцності, межі пропорціональності, залишкової деформації та модуля пружності наведено в табл. 1.

Видно, що ці показники мають дуже невеликий розбіг у значеннях для різних зразків, що свідчить про високу точність вимірювання під час випробувань та стабільність властивостей матеріалу в певних межах. Таким чином, це виправдовує використання обраної методики випробувань.

Таблиця 1

Показники механічних властивостей

Показники	Середнє значення	Довірчий інтервал
Межа пропорційності, МПа	1000	40
Межа міцності, МПа	1150	30
Залишкова деформація, %	0,13	0,02
Модуль пружності (Юнга), ГПа	89	1,0

В табл. 2 наведено порівняльні характеристики кращик аналогів (BT6, Protasul-100), які використовуються на цей час в дентальному протезуванні та розробленого металокерамічного сплаву.

Таблиця 2

Порівняльні характеристики традиційних титанових сплавів та металокерамічного сплаву на основі титану

№	Показники	Техніко-економічні показники		
		кращого аналогу		розробленого об'єкту
		BT6	Protasul-100	
1	Межа міцності на вигин, $\sigma_{\text{виг}}$, МПа	980	990	990
2	Модуль пружності E , ГПа	115	105	105
3	Твердість по Віккерсу, HV	292	330	330

Порівняння комплексу властивостей показує їх перевищення для нових розроблених сплавів в порівнянні з відомими сплавами на основі титану, які широко використовуються на цей час в медицині і конкретно в імплантології.

Фізико-механічні властивості нових металокерамічних сплавів на основі титану гарантують:

- підвищення зносостійкості, що сприяє збільшенню терміну використання імплантантів;
- покращання механічної оброблюваності, що сприяє економії ріжучого інструменту;
- меншу вагу імплантантів, що знижує навантаження на тканини організму;
- мінімальну теплопередачу, що підвищує комфортність співіснування організму хазяїна з імплантантом.

2. Біосумісність нового металокерамічного сплаву на основі титану. В результаті дослідження біосумісності за допомогою МТТ-тесту, було з'ясовано, що всі титанові сплави не виявляють непрямую цитотоксичність у порівнянні з контролем. Також, як видно з рис. 5, не спостерігалось відмінностей між досліджуваними титановими сплавами у впливі на життєздатність та метаболічну активність ММСК (рис. 5).

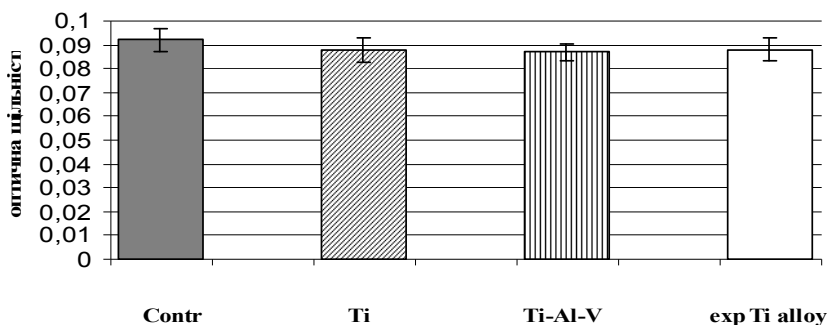


Рис. 5. Оцінка непрямой цитотоксичності титанових сплавів в МТТ-тесті

Відомо, що ММСК є субстрат-залежними клітинами, виживання та проліферація яких неможлива без адгезії. Прикріплення ММСК до відповідних компонентів матрексу також моделює процес диференціювання у різних напрямках [9]. Тому, на цьому етапі роботи ми досліджували здатність різних титанових сплавів впливати на важливу біологічну властивість ММСК – адгезію, яка є основою подальших процесів проліферації та диференціювання.

При вивченні здатності клітин до адгезії було показано, що всі титанові сплави підтримують адгезію клітин кісткового мозку та не

виявляють цитотоксичність (рис. 6, *а*, *б*, *в*). Крім того, з рисунку видно, що між титановими сплавами немає відмінностей стосовно здатності підтримувати адгезію клітин.

Таким чином, зважаючи на високий рівень фізико-механічних властивостей розроблених металокерамічних сплавів на основі титану, що робить їх привабливими для імплантології, доцільно провести випробування біохімічних властивостей цих сплавів, щоб оцінити ступінь біосумісності з тканинами організму (спочатку в експериментах *in vitro*, потім – *in vivo*).

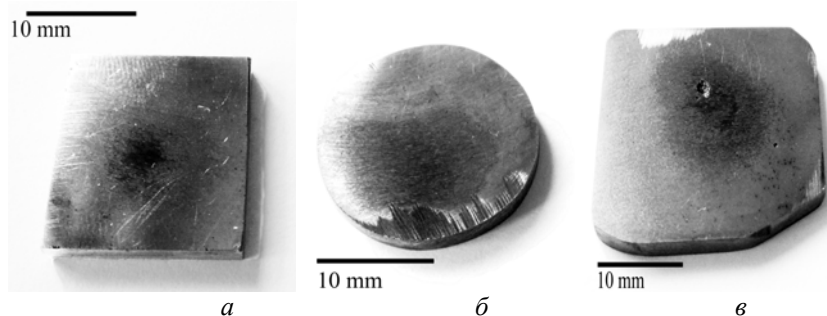


Рис. 6. Адгезія клітин кісткового мозку: *а* – зразок №1 (сплав ВТ1-0 (99 %Ti)); *б* – №2 (сплав ВТ-6 (Ti-Al-V)); *в* – №3 (експериментальний титановий сплав (Ti-Nb-Zr-Si)). Фарбування за Романовським-Гімза

Зокрема, необхідно проведення подальших досліджень цитотоксичності та біосумісності титанових сплавів, спрямованих на встановлення відмінностей між різними типами сплавів у їхньому впливі на швидкість проліферації клітин та на потенціал клітин до диференціювання в остеогенному напрямку.

Висновки

1. Розроблено легуючий комплекс нових металокерамічних матеріалів на основі титану, який забезпечив дію поряд з твердорозчинним механізмом зміцнення евтектичного та евтектоїдного механізмів за участю керамічної фази – силіциду титана, що сприяло підвищенню механічних властивостей у порівнянні з твердорозчинними титановими сплавами.

2. Новий металокерамічний сплав на основі титану не проявляє цитотоксичності при дослідженні на біосумісність в тестах *in vitro*

Список літератури

1. Шехтер А. Б. Тканевая реакция на имплантат / А. Б. Шехтер, И. Б. Розанова // Биосовместимость [под ред. В. И. Севастьянова]. – М., 1999. – 367 с.

2. *Titanium for osteointegration: comparison between a novel biomimetic treatment and commercially exploited surfaces* / C. Giordano, E. Sandrini, B. Del Curto [et al.] // Journal of applied biomaterials and biomechanics. – 2004. – Vol. 2. – P. 35–44.

3. *Early bone tissue responses to turned and oxidized implants in the rabbit tibia* / P. Burgos, L. Rasmusson, L. Meirelles [et al.] // Clinical implant dentistry and related research. – 2008. – Vol. 10, №3. – P.181–190.

4. *Augella A. Mesenchymal Stem Cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches* / A. Augella, T. Kurth, De Bari C. // European cells and materials journal. – 2010. – Vol. 20. – P. 121–133.

5. *ISO 10993-5 «Biological evaluation of medical devices. Part: Test for in vitro cytotoxicity»*: 2009 (E).

6. *Мазур В.І. Кінетика перетворення і структура евтектики у сплавах на основі системи титан-кремній* / В. І. Мазур, С. В. Капустнікова, О. О.Блохіна // Металознавство та обробка металів. – 2001. – №1–2. – С. 94–98.

7. *Mazur V. I. Researching the high-temperature gas corrosion in the new titanium alloys of eutectic type* / V. I. Mazur, S. V. Kapustnikova, O. A. Blokina // 3 rd International Symposium «Corrosion Resistant Alloys». – Cracow, 1996. – С. 141–148.

8 *Новые металлокерамические материалы на основе титана* / Ю. Н. Таран, В. И. Мазур, С. В. Капустникова [и др.] // Металл и литье Украины. – 1999. – № 11–12. – С. 42–46.

9. *Prockop D. Mesenchymal stem cells: methods and protocols* / D. Prockop, D. Phinney, B. Bunnell // Humana Press. – 2008. – 192 p.

Мазур В.И., Капустникова С.В., Мазур А.В., Бондарев С.В., Васильев Р.Г., Лабунец И.Ф. Металлокерамические сплавы на основе титана для использования в имплантологии // Проблеми тертя та зношування: наук.-техн. зб.– К.: НАУ, 2012. –Вип. 57. – С.197–208. Исследованы структура и фазовый состав нового металлокерамического сплава на основе титана. Определены физические и механические свойства

ва этого сплава. Проведены сравнительные исследования биосовместимости металлокерамического сплава и сплавов, которые широко используются в настоящее время в имплантологии. Установлено, что новый металлокерамический сплав на основе титана не проявляет цитотоксичности при исследовании на биосовместимость в тестах *in vitro*.

Табл. 2, рис. 6, список лит.: 9 наим.

Mazur V.I., Kapustnikova S.V., Mazur A.V., Bondarev S.V., Vasiliev R.G., Labunets I.F. Metalceramic alloy based on titanium for using in implantology

A structure and phase composition of new titanium based metal-ceramic alloy have been investigated. Physical and mechanical properties of this alloy have been determined. Comparative researches of biocompatibility of metal-ceramic alloy as well as alloys which are widely used now in implantology have been carried out. It is determined that the new titanium based metal-ceramic alloy has no cytotoxicity during the investigation for the biocompatibility *in vitro* tests.

Стаття надійшла до редакції 15.03.2012