

МОДИФІКАЦІЯ СТРУКТУРИ ГІДРОКСИПАТИТУ ЙОНАМИ МЕТАЛІВ-КОМПОНЕНТАМИ МЕДИЧНИХ ІМПЛАНТІВ

Сухо дуб Л.Ф., Кучма І.Ю., Суходуб Л.Б., Волянський А.Ю.

Інститут прикладної фізики НАНУ

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України

Вступ

Метали та їх сплави є найкращими на сьогодні матеріалами для ортопедичної хірургії, оскільки вони забезпечують необхідні механічні властивості при їх тривалому використанні [1,2]. До найбільш популярних матеріалів для виробництва ендопротезів відносять комерційно чистий титан (ср Ti), або сплав титану з алюмінієм та ванадієм (TiAl6V₄), а також широко застосовують сплав хрому (Cr) з кобальтом (Co)/

Але, незважаючи на стійкість проти корозії, всі металеві поверхні в біологічних умовах кородують, тобто втрачають йони металів, які в подальшому мігрують у тканини, що оточують імплант. Під час процесів ремодуляції кісткової тканини після хірургічної операції внесення імпланту, присутність йонів металів може суттєво впливати на ріст або резорбцію нової тканини.

Фізіологія росту кісткової тканини і основні підступи до її штучного культивування.

Ріст кісткової тканини — комплексний біологічний процес, що включає в себе значну кількість різноманітних біомолекул (колаген, протеїни, фактори росту та ін.) та клітин (остеобласти, остеокласти). Використовуючи модельні підходи, можна отримати інформацію про молекулярні механізми кісткоутворення, одним із ключових серед яких є процес мінералізації колагенового матриксу, що формується остеобластами. Цей процес включає в себе утворення кальцій-фосфатного осаду з подальшою трансформацією аморфної фази в гідроксилапатит (ОНАр) — Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Головним попередником ОНАр можна вважати аморфний фосфат кальцію (АСР). Біомолекули, що присутні у фізіологічній рідині кістки, виконують різноманітні функції впливу на процес мінералізації, як-то: контроль кальцифікації, (шляхом регуляції транспорту йонів Ca²⁺), або інгібування спонтанної мінералізації [3,4]. Вплив йонів металів на біомінералізацію може проявитися як у безпосередньому впливі на розвиток клітин кісткового мозку, так і у впливі на суто хімічному або кристалографічному рівні. З цього випливає, що проблема біосумісності з медичними імплантами є ключовою в пошуку нових більш ефективних біоматеріалів. Протягом останніх років проводяться дослідження клітинних культур, включаючи також клітини з кісткового мозку кістки людини [5] на предмет біосумісності з ортопедичними матеріалами. Реакція клітини у разі контакту з біоматеріалами може бути описана через параметри адгезії, росту та розмноження. Протікання кожної із стадій залежить не тільки від природи матеріалу як такого, але й від шорсткості поверхні матеріалу та хімічного складу шару інтерфейсу між імплантом та оточуючою біорідиною. Глибоке розуміння механізмів взаємодії в інтерфейсі є ключовим для впливу на біосумісність медичних імплантів. Цей напрямок досліджень формується як окрема наука - біологічна фізика поверхні. Ініціатор цього напрямку Б. Касімо дає таке трактування новому науковому терміну: - це широка міждисциплінарна сфера, в якій досліджуються процеси та властивості в інтерфейсах між синтетичними матеріалами та біологічним оточенням, а також створюються біофункціональні поверхні. Прикладами об'єктів нової науки можуть бути такі, як медичні імпланти, біосенсори та біочіпи для діагностики, інженерія тканин, біоелектроніка, біоімітовані матеріали, подібні шкірі дельфіна або акули та інше. Достатньо висока остеointegraція металевого імпланту перш за все потребує чіткого процесу адгезії клітин, що формують кістку, а також відсутності негативного впливу поверхні імпланту на властивість цих клітин нарощувати клітинний матрикс. Знайдено, що йони кобальту та хрому більш негативно впливають на ці властивості клітин у порівнянні з титановими імплантами [6]. Типовий приклад розподілення елементів матеріалу модельного імпланту у прилеглий кістковій тканині після експерименту *in vivo* приведено на Рис. 1 [10].

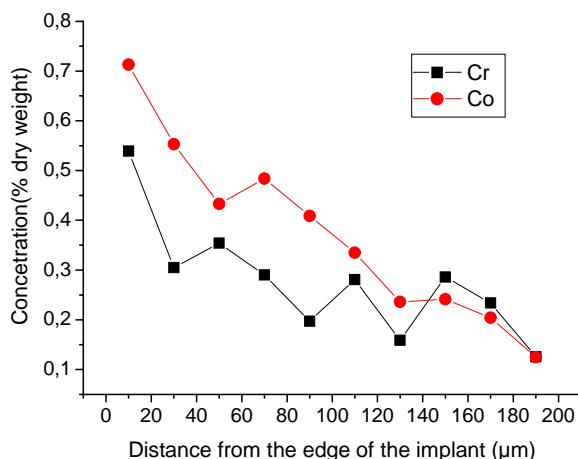


Рис. 1. Виміри складових елементів Cr, Co модельного імпланту у радіальному напрямку від зони „імплант-кісткова тканина” інтерфейсу

Для того, щоб виключити вплив властивостей поверхні на поведінку клітинних культур, замість впливу клітин на металеві поверхні, вчені почали використовувати альтернативні методи інкубації клітинних культур у

клітинних середовищах, що містили в собі йони металів. Так, розчин йонів з кобальтхроммолібденового імпланту виявився токсичним щодо кісткових клітин у межах концентрацій, які означено у фіброзних капсулах навколо ортопедичного імпланту [7]. Йони титану у відносно малих концентраціях (біля 5 ppm) діють як інгібітори депозиції мінералів і можуть пригнічувати розмноження клітин при концентраціях більших, ніж 10 ppm. Це дуже важливо, оскільки було знайдено, що у фіброзних капсулах концентрація титану може сягати рівня 21 ppm [5]. У йонів титану та алюмінію виявлена також уповільнююча дія на формування остеокальцину-протеїну, котрий відіграє важливу роль у регуляції кальцифікування екстраклітинного матриксу.[8].

Мінералізація кісткової тканини визначається не тільки комплексною взаємодією клітин, гормонів та внутрішньоклітинних метаболітів та неорганічного будівельного матеріалу, але й фізико-хімічними параметрами, що керують процесами кристалізації взагалі. *In vivo* симуляція останніх пов'язана зі значно меншими труднощами у порівнянні з вивченням клітинних культур. Так, наприклад, для дослідження формування ОНАр його синтезують згідно реакції:



Оскільки одним з продуктів є азотна кислота, що окислює середовище, для формування ОНАр необхідно підтримувати рівень рН додаванням гідроксиду амонію. Формування апатиту може бути сповільнене через, наприклад, присутність молекул з Р-О-Р зв'язками (пірофосфати, аденозинтрифосфат). Ці молекули затримують початок кристалізації ОНАр у результаті блокування росту поверхні через їх адгезію. Йони металів (ванадію, титану) також демонструють негативний вплив на кристалізацію апатиту. Також було показано, що йони титану можуть входити до складу продуктів синтезу ОНАр [8].

Матеріали та методи дослідження

В роботі, яка виконувалася в рамках україно-німецького проекту між Інститутом прикладної фізики НАНУ (проф. Суходуб Л.Ф.) та Інститутом ядерної фізики Мюнстерського університету Німеччини (Академічний директор Сулкіо-Клефф Б.), була використана модельна система синтезу ОНАр (1) в присутності йонів металів титану, кобальту, ванадію, хрому різних концентрацій. Йони металів додавали у вигляді розчинів їх солей: титан (III) - хлориду (TiCl_3 20% у 3% розчині HCl), ванадій (III) - хлориду (VCl_3), кобальт (III) - нітриту гексагідрату $\text{Co}(\text{NO}_2)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ з концентраціями у межах від 0,5% до 20%. Всі метали додавалися до розчину нітрату кальцію за 10 хвилин до додавання до нього гідрофосфату амонію. Для аналізу кристалографічної структури синтезованих зразків ОНАр був використаний метод рентгеноструктурного аналізу (РСА). Різноманітні полікристалічні

фази були проаналізовані та ідентифіковані за допомогою бази даних ICPDS – International Center for Diffraction Data Powder Diffraction file 1-40, 1990. Дослідження проводились на дифрактометрі Siemens D 5000 (рис. 2) в Інституті ядерної фізики, Мюнстер, Німеччина.

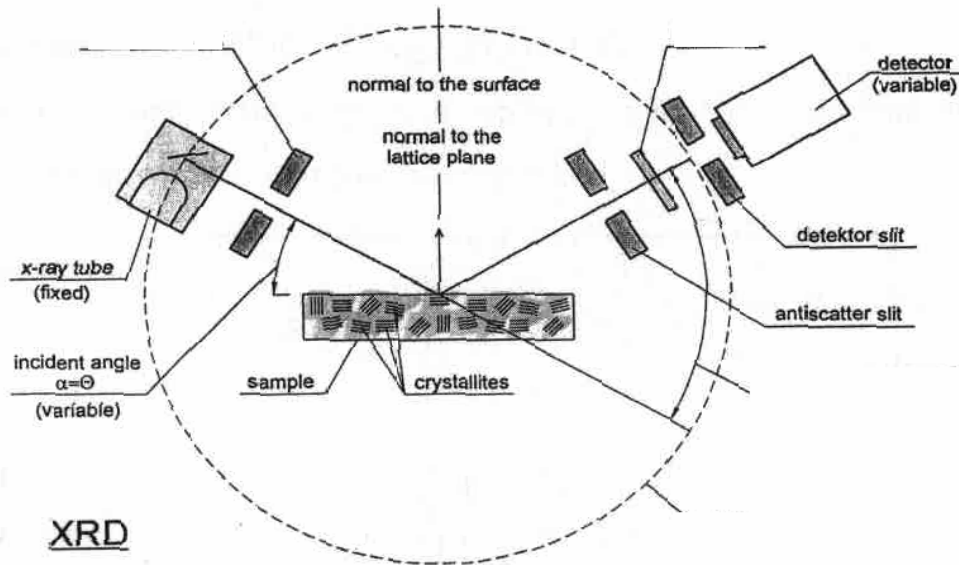


Рис. 2 Схема дифрактометра Siemens D 5000 для PCA. Всі інтенсивності для 2θ кутів відповідають площинам решітки згідно закону Брегга. Всі θ_{hkl} рефлекси (піки в спектрах) відповідають одним і тим же кристалітам.

Результати та обговорення

Дифрактограми ОНАр, що був синтезований без додавання йонів металів відповідали стехіометричному ОНАр. Після прогріву при 1000°C відбувалося збільшення розмірів кристалітів (L) та виникнення додаткового піку, що відповідає фазі α -трикальційфосфату (α -ТСП, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Ця додаткова фаза вірогідно виникла в результаті термічного розкладу залишкової фази аморфного кальцій фосфату (АСР), що містилась у зразку. Додавання іонів металів до модельних сумішей привело до появи різноманітних ефектів їх впливу в залежності від концентрації доданого металу та температури прогріву зразку. У непрогрітих зразках спостерігалось зменшення кристалічності, що відображалось на зниженні інтегральної інтенсивності піків та розміру кристалів, що було видно з розширення піків. Після прогріву при 900°C та 1000°C на дифрактограмах з'явилися додаткові фази, які відповідали α -ТСП та β -ТСП зі співвідношенням $\text{Ca/P}=1,5$ (для стехіометричного ОНАр $\text{Ca/P}=1,67$). Появу β -ТСП можна пояснити розкладом з ростом температури нестехіометричного НА ($\text{Ca/P}<1,67$), або можливою інкорпорацією карбонатного йону CO_3^{2-} у структуру ОНАр, що призводить до утворення так званого основного апатиту - ВСаР. Розклад останнього відбувається при температурі більше 900°C згідно реакції [9] :

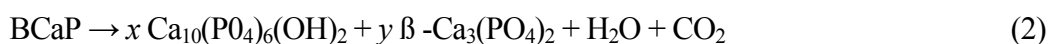


Рис.3 демонструє дифрактограму для зразку, що був синтезований у присутності 4% титану та прогрітий при 1000°C .

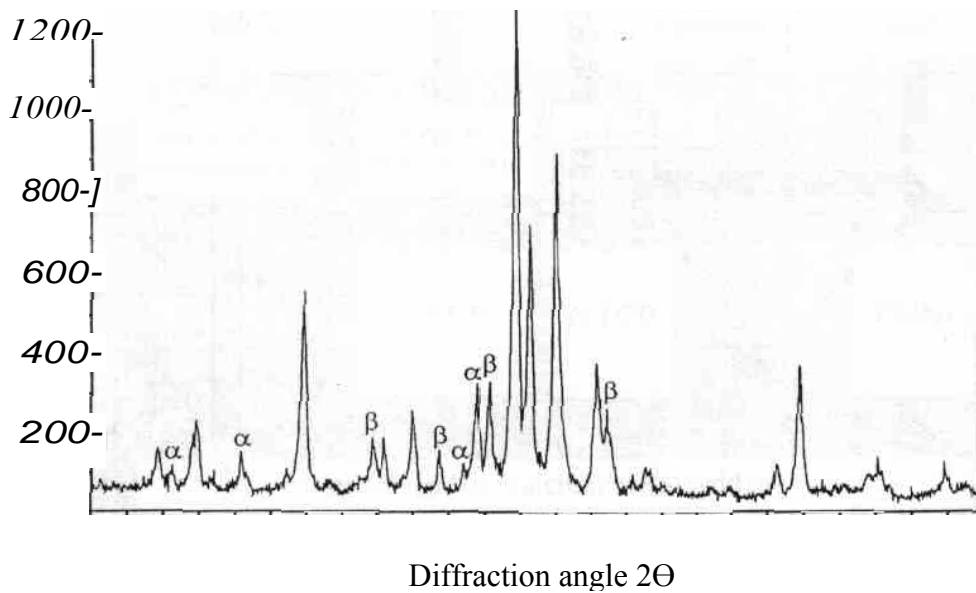


Рис.3 Дифрактограма зразку гідроксиапатиту, синтезованого у присутності 4% титану та прогрітого протягом однієї години при 1000 °С. Піки, що не мають позначок, відповідають ОНАр (ASTM-9-0432)

, α- позначка для α – ТСР; β - позначка для - β ТСР.

Цей зразок характеризується великим вмістом α-ТСР та β-ТСР. Ці дві модифікації ТСР спостерігалися в усіх прогрітих зразках, синтезованих у присутності йонів металів, за виключенням кобальту, для якого піки α- та β-ТСР були значно зміщені від звичайних положень. Цей результат свідчить про формування фази α- та β-ТСР з частковим заміщенням йонів кальцію йонами кобальту. Таким чином, поява цих двох трикальційфосфатних фаз відображає порушення процесів кристалізації ОНАр через додавання йонів металів. Поява додаткових фаз - оксидів металів (ТіО₂ та інших) при високих температурах говорить про те, що йони металів не тільки порушують процеси кристалізації ОНАр, але й мають властивість до включення у кристалічну решітку основної фази (ОНАр), що приводить до виникнення нестехіометричного ОНАр. Рис. 4 демонструє модель шляхів трансформації АСР в залежності від температури прогріву зразків, отриманих при участі йонів металів.

Висновки

В результаті проведених досліджень доведено провокування мінералізації ОНАр металами (Ті, V, Со, Сг, Аl), що призводило до: зменшення кристалічності та розміру кристалів; порушення стехіометричності гідроксиапатитної фази (Са/Р < 1,67); інкорпорації йонів металів у різні кальційфосфатні фази.

Незважаючи на те, що хімічна система мінералізації гідроксиапатиту, яка була використана у цій роботі, виглядає досить просто у порівнянні з реальними біологічними системами, ефекти, що спостерігалися в ній, треба брати до уваги при розгляданні остеоінтеграції *in vivo*.

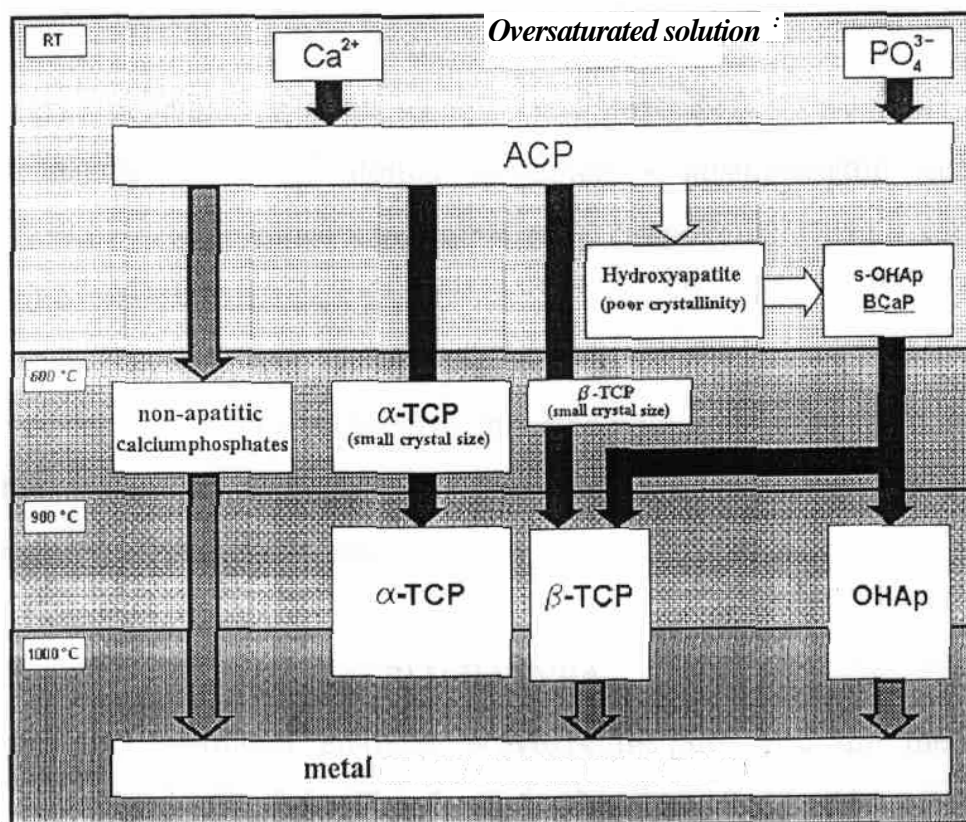


Рис. 4 Схематична діаграма можливого впливу йонів металів на модельні системи синтезу гідроксиапатиту при значеннях $pH \geq$. Трансформація АСР в ОНАр порушується (біла стрілка) у бік формування нестехіометричного апатиту (показаний у вигляді підкресленого ВСаР). Стрілки, що проходять через кордони температурних зон демонструють викликані термальним прогрівом трансформації або порушення у модельних системах, викликані нонами металів. Чорні стрілки відповідають шляхам трансформації, що закономірні для модельних систем без домішок металів, в той час як сірі стрілки демонструють шляхи трансформації, можливі тільки для систем з вмістом металів.

УДК: 549.903 538

МОДИФІКАЦІЯ СТРУКТУРИ ГІДРОКСИАПАТИТУ ЙОНАМИ МЕТАЛІВ-КОМПОНЕНТАМИ МЕДИЧНИХ ІМПЛАНТІВ

Суходуб Л.Ф., Кучма І.Ю., Суходуб Л.Б., Волянський А.Ю.

В статті висвітлюється одна з проблем інтерфейсу «імплант-кісткова тканина», а саме: вплив йонів металів-кокомпонентів медичних ендопротезів на структурні характеристики гідроксиапатиту- мінеральної частини кісткової тканини.

УДК: 549.903 538

МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ ГИДРОКСИАПАТИТА ИОНАМИ МЕТАЛЛОВ- КОМПОНЕНТАМИ МЕДИЦИНСКИХ ИМПЛАНТОВ

Суходуб Л.Ф., Кучма И.Ю., Суходуб Л.Б., Волянский А.Л.

В статье освещается одна из проблем интерфейса «имплант- костная ткань», а именно: влияние ионов металлов- компонентов медицинских эндопротезов на структурные характеристики гидроксиапатита-минеральной части костной ткани.

MODIFICATION THE STRUCTURE OF HYDROXYAPATITE BY METAL IONS- COMPONENTS OF MEDICAL IMPLANTS

Sukhodub L.F., Kuchma I.Yu., Sukhodub L.B., Volyansky A.Yu.

In the paper one of the problems connected with an interface “implant-bones”, namely, the influence of metal ions-constituents of medical implants on the hydroxyapatite structure is described.

Список літератури

1. Jones F.N. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials // Surface sci. repts. - 2001. - 42, No 3-5. -P. 75-206
2. Ozawa S., Kasugai S. Evaluation of implant materials (hydroxy apatite, glass-ceramics, titanium) in rat bone marrow stromal cell culture // Biomat. - 1996. -17.-P. 23-29
3. Boskey A.L. Mineral analysis provides insights into the mechanism of biomineralization // Calc. Tiss. Int. - 2003. - 72. - P. 533-536
4. Jahnen-Dechent W., Schafer C., Heiss A., et al. Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein ccs- HS glycoprotein / fetuin // Zeitschr. f. Kard. - 2001. - 90 (Suppl.3). -P. III/47-III/56
5. Dorr L.D., Bloebaum R., Emmanual J. et al. Histologic, biochemical, and ion analysis of tissues and fluids retrieved during total hip arthroplasty // Clin. Orthop.1990. 261. P. 82-959.
6. Wilke A., Orth J., Fuhrmann R., et al. Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures // J. of Biomed. Mat. Res. -1998 40.- P. 301-306
7. Puleo D.A. Huh W.W. Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells // J. Appl. Biomat. - 1998. - 6. -P. 109-116
8. Layani J.D., Mayer I., Cuisiner F.J.G. Carbonated hydroxyapatites precipitated in the presence of Ti // J. Inorg. Biochem. - 2000. - 81. - P. 57-63
9. Elliot J.C. Structures and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates // Elsevier, Amsterdam - London - New York - Tokyo - 1994.
10. Суходуб Л.Ф., Персональне повідомлення