

Остеогенерирующие свойства кальций-фосфатного покрытия на сплаве титана Ti-6Al-4V *in vivo*

Аннотация

В современной имплантологии задача разработки способов формирования биопокрытий, улучшающих характеристики металлической основы имплантата, является важной и актуальной. Создание на поверхности имплантата биоактивных слоев, обладающих высокой совместимостью с костной тканью, целесообразно для лучшей адаптации организма к имплантату. Такие покрытия при введении в живой организм, не оказывая отрицательного (токсического) воздействия на его деятельность, должны усиливать остеоинтеграцию с костной тканью, стимулировать процессы ее регенерации. Наибольший интерес представляют биоактивные кальций-фосфатные слои, содержащие в своем составе «родные» для костных тканей соединения фосфатов кальция. Исследования по данной теме предвещают развитие нового метода в медицине – инженерии костной ткани.

Разработан способ формирования кальций-фосфатного биоактивного покрытия методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) на медицинском сплаве титана ВТ6 (3,5...5,3 % мас. V; 5,3...6,8 % мас. Al; остальное – Ti). Кальций-фосфатное покрытие получено в биполярном режиме ПЭО в глицерофосфатсодержащем электролите. Проведена оценка остеогенерирующих свойств покрытия при переломе диафизарной части бедренной кости лабораторных крыс линии Вистар. Установлено, что кальций-фосфатное ПЭО-покрытие ускоряет остеогенез и способствует образованию хорошей периостальной мозоли в месте перелома.

Введение

Титан и его сплавы широко используются для изготовления дентальных и ортопедических имплантатов, искусственных суставов, пластин и винтов для фиксации переломов благодаря уникальному сочетанию физических, электрохимических и механических свойств (высокому пределу прочности, превосходной коррозионной стойкости, износостойкости, высокой твердости и низкой плотности) [1]. Около 30 % медицинских изделий выполнены из сплава ВТ-6 (зарубежный аналог Ti-6Al-4V). Пассивный оксидный слой на поверхности сплава обеспечивает хорошую биосовместимость и защищает металлическую подложку от агрессивной биологической среды [2], [3]. В работах [4], [5] проведена оценка *in vitro* различных медицинских сплавов титана и зафиксирован выход ионов V^{2+} и Al^{3+} в различные модельные растворы. Наличие таких элементов в мягких тканях способствует увеличению количества выделяемых медиаторов воспаления, которые могут участвовать в процессе остеолиза [6]. Для улучшения биосовместимости сплава титана ВТ6 на поверхности материала формируют биоактивные слои, содержащие в своем составе минеральные компоненты костной ткани, в том числе гидроксиапатит. Для формирования покрытий применяются следующие способы: плазменное напыление [7], газотермическое напыление с последующим микродуговым оксидированием [8], импульсное лазерное спекание [9], электрофоретическое осаждение [10], биомиметическое осаждение [11] и т. д. Несмотря на целый ряд достоинств вышеперечисленных разработок, отметим, что для получения покрытия этими методами в качестве исходного реагента требуется гидроксиапатит, себестоимость которого достаточно высока. Следовательно, для прогресса в этом направлении необходимо разработать новые экономически целесообразные способы синтеза и нанесения гидроксиапатита на поверхность титановых имплантатов. Такая модификация поверхности позволит обеспечить лучшую биосовместимость имплантата с костной тканью и уменьшить побочные негативные явления, имеющие место при использовании металлического имплантата без покрытия.

Среди известных электрохимических способов нанесения покрытий на поверхность металлических имплантатов наибольшим преимуществом обладает метод плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) [12]-[15]. В процессе ПЭО происходит синтез на поверхности металла/сплава покрытий, в состав которых входят как элементы оксидируемого материала, так и компоненты электролита.

Целью рассматриваемой работы являлась оценка результатов остеосинтеза при переломе диафиза бедренной кости на крысах линии Вистар. Фиксация перелома осуществлялась

шпурпами из сплава титана ВТ-6 без покрытия и с кальций-фосфатным покрытием, полученным на поверхности материала обрабатываемого сплава методом ПЭО.

Объекты и методы

Для проведения эксперимента были использованы 2 типа имплантатов (без покрытия и с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием): стандартные титановые винты сплава ВТ-6 (производитель НПО «Деост», Россия). Состав сплава: 0,015 N; 0,05 N; 0,1 C; 0,1 Si; 0,2 O; 0,3 Zr; 0,6 Fe; 3,5...5,3 V; 5,3...6,8 Al; остальное Ti, % мас. Размерный ряд используемых винтов зависел от размеров костномозгового канала бедренных костей экспериментальных животных. В основном использовались винты длиной от 26 до 30 мм, диаметром 2,0 и 2,3 мм.

Плазменное электролитическое оксидирование проводили в биполярном режиме [14], [15] в электролите, содержащем 30 г/л глицерофосфата кальция $(C_3H_7O_6P)Ca \cdot 2H_2O$ и 40 г/л ацетата кальция $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$. В качестве источника тока использовался реверсивный тиристорный агрегат. Частота поляризующих импульсов составляла 300 Гц. Коэффициент заполнения поляризующего сигнала был равен 0,5. Контроль электрических параметров осуществлялся автоматизированной системой управления и контроля, сопряженной с компьютером, оснащенным соответствующим программным обеспечением.

Эксперимент проводился на половозрелых самцах крыс линии Вистар весом 200...250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария в соответствии с «Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» (№ 1045-73 от 06.04.1973 г.). Все эксперименты были выполнены в соответствии с правилами бережного обращения с лабораторными животными и правилами проведения работ и использования экспериментальных животных (приложение 3 к Приказу № 755 от 12.08.1977 г. МЗ СССР), порядок проведения исследования был одобрен этическим комитетом ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России. Кормление крыс осуществлялось в соответствии с нормами № 163, утвержденными МЗ СССР от 10.03.1986 г.

Животные были разделены на 2 группы: контрольную (имплантат без покрытия) и опытную (имплантат с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием). В данном исследовании моделировался закрытый перелом диафизарной части бедренной кости крысы. Фиксация отломков бедренной кости осуществлялась способом закрытого интрамедуллярного ретроградного остеосинтеза винтом с рассверливанием костно-мозгового канала. Животных выводили из эксперимента на 28-е и 42-е сутки после операции.

Для диагностики перелома и корректной постановки имплантата использовали метод визиографии с помощью рентге-

новского аппарата «Evolution x3000» («Asepti») в боковой проекции с экспозицией в течение 0,08 с при напряжении на трубке 40 кВ и токе разряда 25 мА.

Результаты и обсуждение

В работах [14], [15] был предложен способ формирования на сплаве титана VT1-0 методом ПЭО покрытия, содержащего фосфаты кальция, в том числе и гидроксиапатит. Проведенный комплекс физико-химических исследований продемонстрировал перспективность применения данного материала в имплантационной хирургии. Было установлено, что при подкожной имплантации в организм лабораторных мышей в течение 45 суток на поверхности кальций-фосфатных ПЭО-покрытий формировалась костная ткань толщиной до 50 мкм. На необработанной методом ПЭО поверхности в указанный период времени рост костной ткани не наблюдался. В данной работе методика формирования кальций-фосфатного покрытия была применена для имплантата, непосредственно вводимого в поврежденное место кости. В отличие от подкожной имплантации [15] этот способ проверки наиболее приближен к практическим условиям хирургической практики.

По результатам рентгенологических исследований у одного животного с титановым имплантатом без покрытия на 28-е сутки прослеживается слабая периостальная реакция в зоне перелома, но сращение не выражено (рис. 1).



Рис. 1. Рентгенограмма перелома в средней трети диафиза (стрелка) у животного с титановым имплантатом без покрытия: слабая периостальная реакция, сращения нет (28-е сутки после операции)

У всех животных опытной группы, где использовали титановые имплантаты с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием на поверхности, произошла полная консолидация перелома за четыре недели (рис. 2). Следует отметить, что уже через две недели крысы начали активно пользоваться лапой в отличие от подопытных крыс с имплантатом без покрытия.

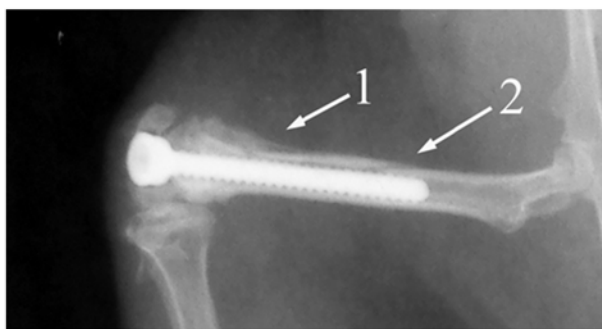


Рис. 2. Рентгенограмма сложного перелома бедренной кости у животного опытной группы, где использовали титановые имплантаты с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием. Основная линия излома проходит в надмышечковой зоне (1), большой осколок доходит до средней трети диафиза (2). Видна хорошая периостальная мозоль (28-е сутки после операции)

В серии животных опытной группы, выведенных из эксперимента на 42-е сутки, у всех крыс зафиксированы яркие рентгенологические признаки полной консолидации переломов: выраженная костная мозоль, отсутствие видимой линии перелома (рис. 3).



Рис. 3. Рентгенография у животного опытной группы, где использовали титановые имплантаты с кальций-фосфатным ПЭО-покрытием через 42 суток после операции: выраженная костная мозоль; линия, где проходил перелом, не видна

Модификация поверхности титановых имплантатов методом ПЭО позволяет получать покрытия с необходимыми для увеличения биологической активности морфологией и составом, фазовым и элементным. Использование биполярного режима оксидирования обеспечивает подвод к границе раздела как анионов, так и катионов, формируя кальций-фосфатные покрытия, близкие по составу к минеральной составляющей костной ткани [15]. По своим механическим характеристикам покрытия приближаются к механическим характеристикам кости. Биологическая активность поверхностных слоев определяется суперпозицией специфических параметров: химическим составом, в частности значениями концентраций кальция и фосфора, а также их соотношением и морфологическими особенностями (шероховатостью) кальций-фосфатного покрытия на поверхности титановых имплантатов. Механизм влияния кальций-фосфатного покрытия на регенерацию костной ткани обусловлен совокупностью нескольких факторов, одним из которых является участие биоактивного покрытия в процессе формирования новой костной ткани в качестве поставщика необходимых элементов, в частности кальция и фосфора. Физические и химические свойства гидроксиапатита $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ обеспечивают ему идеальную биосовместимость, активно стимулируя остеогенерацию и восстановление костной ткани. Другим фактором является повышение прочности соединения костной ткани с имплантатом путем нанесения на него покрытия, состоящего из родственных организму материалов. В силу сходства состава минеральной составляющей кости и покрытия устанавливается прочная химическая связь между имплантатом и окружающей тканью, обеспечивая надежную фиксацию обломков кости в необходимом положении.

В группе животных с имплантатом без покрытия в двух случаях костная мозоль не была столь выраженной, тем не менее консолидация сомнений не вызвала (рис. 4а).

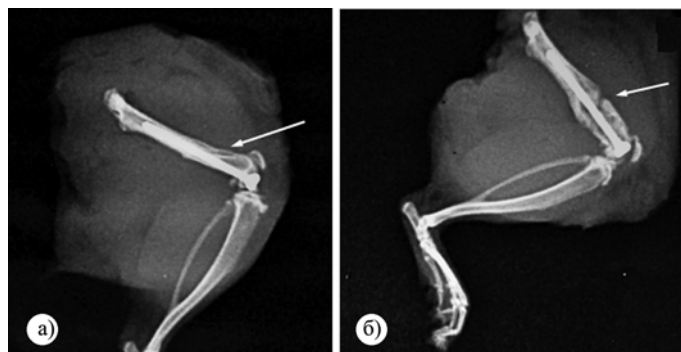


Рис. 4. Рентгенограмма животного из контрольной группы с винтом без покрытия (а): костная мозоль не выражена, стрелкой указана линия излома (42-е сутки после операции); б) зона несращения

У одной крысы прослеживалась отчетливая зона несращения по переднему контуру диафиза (рис. 4б).

На макропрепарате данного животного видно, что место перелома по всей окружности заполнено рубцовой тканью, при удалении которой признаков костной мозоли не обнаружено, имел место классический несросшийся перелом бедренной кости.

Таким образом, в данной операции воспроизводился закрытый малоинвазивный вид остеосинтеза, который обеспечивает не прямое сращение перелома. Данный способ остеосинтеза и вид сращения в клинической практике является оптимальным для диафизарных переломов бедренной кости. Полученные результаты полностью подтверждают выводы предшествующих исследований [14], [15] о благоприятном влиянии биоактивных покрытий, содержащих гидроксиапатит, на рост и восстановление костной ткани.

Выводы

В результате эксперимента на крысах линии Вистар установлено, что кальций-фосфатное покрытие, полученное методом ПЭО, оказывает положительное влияние на остеосинтез при лечении перелома диафизарной части бедренной кости. Гидроксиапатит, находящийся в составе биоактивного покрытия, выступает в роли инициатора роста (прекурсора) в процессе остеогенеза, существенно сокращая период выздоровления.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14-33-00009) и Правительства РФ (Федерального агентства научных организаций).

Коллектив авторов благодарит за проведение иммуноцитохимического исследования д.м.н. Сергея Георгиевича Калининченко и д.м.н. Наталью Юрьевну Матвееву.

Список литературы:

1. Bordji K., Jouzeay J.Y., Mainard D., Payan E., Netter P., Rie K.T., Stucky T., Hage M. Ali. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts // *Biomaterials*. 1996. Vol. 17. PP. 929-940.
2. Bruni S., Martinesi M., Stio M., Treves C., Vacchi T., Borgioli F. Effects of surface treatment of Ti-6Al-4V titanium alloy on biocompatibility in cultured human umbilical vein endothelial cells // *Acta Biomaterials*. 2005. Vol. 1. PP. 223-234.
3. Kohn D.H. Metals in medical applications // *Current Opinion in Solid State & Materials Science*. 1998. Vol. 3. PP. 309-316.
4. Jacobs J.J., Skipor A.K., Black J., Urban R.M., Galante J.O. Release and excretion of metal in patients who have a total hip replacement component made of titanium-base alloy // *The Journal of Bone Joint & Surgery*. 1991. Vol. 73. № 10. PP. 1475-1486.
5. Okazaki Y., Gotoh E. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26. PP. 11-21.
6. Haynes D.R., Rogers S.D., Hay S., Percy M.J., Howie D.W. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles // *The Journal of Bone Joint & Surgery*. 1993. Vol. 75. № 6. PP. 825-834.
7. Groot K., Geesink R., Klein C., Serekian P. Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2004. Vol. 21. PP. 1375-1381.
8. Кацура В.А., Фомина М.А., Родионов И.В., Фомин А.А. Нанопористая структура покрытий, сформированных газотермическим напылением электрокорунда и последующим микродуговым оксидированием на имплантатах из титанового сплава ВТ6 // *Медицинская техника*. 2016. № 1. С. 38-41.

9. Cleries L., Martinez E., Fernandez-Pradas J., Sardin G., Esteve J., Morenza J. Mechanical properties of calcium phosphate coatings deposited by laser ablation // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21. PP. 967-971.
10. Han Y., Fu T., Lu J., Xu K. Characterization and stability of hydroxyapatite coatings prepared by an electrodeposition and alkaline-treatment process // *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000. Vol. 54. PP. 96-101.
11. Habibovic P., Barrere F., Blitterswijk C.A., Groot K., Layrolle P. Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants // *Journal of the American Ceramic Society*. 2002. Vol. 85. PP. 517-522.
12. Колобов Ю.П., Шаркеев Ю.П., Карлов А.В., Легостаева Е.В., Шапкина Г.А., Хлусов И.А., Братчиков А.Д., Ерошенко А.Ю., Поженько Н.С., Шапкин А.Б. Биокомпозиционный материал с высокой совместимостью для травматологии и ортопедии // *Деформация и разрушение материалов*. 2005. № 4. С. 2-9.
13. Шапкина Г.А., Шаркеев Ю.П., Колобов Ю.П., Карлов А.В. Кальций-фосфатное покрытие на титане и титановых сплавах и способ его нанесения / Патент РФ. № 2291918. 2005. Бюл. изобретений. 2007. № 56.
14. Шаркеев Ю.П., Псахье С.Г. и др. Биокомпозиты на основе кальций-фосфатных покрытий, наноструктурных и ультрамелкозернистых биоинертных металлов, их биосовместимость и биодеградация. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2014. 596 с.
15. Gnedenkov S.V., Sharkeev Yu.P., Sinebryukhov S.L., Khrisanfova O.A., Legostaeva E.V., Zavidnaya A.G., Puz' A.V., Khlusov I.A., Opra D.P. Functional coatings formed on the titanium and magnesium alloys as implant materials by plasma electrolytic technique: Fundamental principals and synthesis conditions // *Corrosion Reviews*. 2016. Vol. 34 (1-2). PP. 65-83.

Сергей Васильевич Гнеденков,
чл.-кор. РАН,
д-р хим. наук, профессор,
зам. директора по научной работе,
зав. отделом электрохимических систем
и процессов модификации поверхности,
Сергей Леонидович Синебрюхов,
д-р хим. наук, доцент,
зав. лабораторией нестационарных
поверхностных процессов,
Артем Викторович Пузь,
канд. хим. наук,
зав. лабораторией композиционных
покрытий биомедицинского назначения,
ФГБУН «Институт химии Дальневосточного
отделения Российской академии наук»,
Роман Евгеньевич Костив,
канд. мед. наук, врач-травматолог,
ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный
медицинский университет»,
г. Владивосток,
e-mail: svg21@hotmail.com